

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



## **Avaliação do potencial de patogenicidade de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos tradicionais Portugueses**

Francisca Nascimento Eusébio

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**

Dissertação orientada por:  
Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek  
Ana Maria Gonçalves Reis



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária sob orientação direta da Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

A Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, queria agradecer à minha orientadora, Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, por toda a paciência que teve ao longo do tempo e por me proporcionar todas as condições para o desenvolvimento deste trabalho, de outra maneira seria impossível a realização deste.

Gostaria de agradecer à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa por me ter acolhido e permitido a elaboração do meu trabalho nas suas instalações.

Quero agradecer à minha orientadora interna, Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis por todo o apoio.

Agradeço a todos aqueles que me apoiaram na FMV: professora Doutora Maria João Franqueza, Maria Helena Fernandes e Engenheira Maria José Fernandes.

Agradeço também a todos as pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram para a conclusão desta etapa. Desta forma destaco Rui Nunes, Isabel Santos, Francisco Brum, Leticia Vieira, Ana Silva, Carolina Bernardino, Vanessa Félix e Sandra Bastos.

Por fim, e não menos importante agradeço aos meus pais, avós, às minhas primas Maria João e Madalena e ao meu primo Luís por todo o apoio, e pela força que me deram ao longo destes 2 anos. Sem eles, eu nunca conseguiria realizar este percurso.

## Resumo

Os queijos de Nisa e Azeitão fazem parte da lista dos queijos portugueses com Denominação de Origem Protegida (DOP). Apesar de serem produzidos em regiões distintas, apresentam algumas semelhanças, tais como a utilização de leite de ovelha cru e o tipo de coalho (*Cynara cardunculus*). A produção destes queijos conta com a ação de bactérias ácido lácticas que estão presentes no processo de fermentação e de maturação, tendo estas contribuições relevantes para as propriedades organoléticas do produto final. Estas bactérias, apesar de apresentarem inúmeras vantagens tecnológicas, podem ser veículos de transmissão de genes, tanto de resistência a antibióticos, como de fatores de virulência.

Nesse contexto, esta dissertação teve como objetivo a caracterização microbiana de bactérias ácido lácticas, particularmente *Enterococcus* spp., e a avaliação do seu potencial de patogenicidade. Por fim, a comparação entre os resultados obtidos no presente estudo e os obtidos ao longo dos anos 2016-18.

Durante o ano de 2019 foram recolhidos queijos produzidos em queijarias tradicionais de Azeitão e Nisa. A partir dessas amostras foram isoladas as bactérias ácido lácticas, recorrendo a diferentes meios de cultura. De seguida, para a avaliação da diversidade microbiana dos isolados, foi aplicada a técnica de RAPD-PCR. A análise dos perfis obtidos permitiu a construção de dendrogramas e a partir destes foi possível avaliar a semelhança genómica entre os isolados, e consequentemente fazer a escolha dos representantes e calcular índices de diversidade.

Os resultados obtidos para os queijos em análise, mostraram que os *Lactococcus* spp. são o grupo predominante, estando *Enterococcus* spp. presente em número mais reduzido, apesar da sua elevada diversidade genómica (demonstrada pelo cálculo dos índices de diversidade). Estes resultados foram concordantes com os obtidos em anos transatos.

Uma análise mais detalhada dos enterococos, mostrou ser a espécie *E. faecalis* a predominante nos queijos DOP em estudo, seguida das espécies *E. faecium* e *E. durans*.

Quanto à resistência a antibióticos, a mesma foi estudada com recurso a técnicas de difusão em disco e PCR-multiplex dirigido a determinantes de resistência. Foram observadas algumas diferenças no número de isolados resistentes ao longo dos anos de estudo. *Enterococcus* sp. mostraram ser resistentes à grande maioria dos antibióticos estudados e foi ainda identificado um isolado multirresistente.

Em relação aos genes de resistência pesquisados, concluímos que 100% dos isolados resistentes à tetraciclina apresentam o gene *tet(M)*, 67% dos isolados resistentes à eritromicina apresentam o gene *erm(B)* e, por fim, o isolado resistente à vancomicina não apresenta os genes *van(A)* ou *van(B)*.

Relativamente à pesquisa de fatores de virulência, verificou-se que 26% dos isolados apresentavam atividade positiva para a hemólise, uma percentagem bastante superior às obtidas em anos anteriores, 45% dos enterococos demonstraram resultados positivos para a produção de gelatinase e 40% apresentaram atividade proteolítica. Dos genes de virulência pesquisados, nenhum isolado tinha presente no seu genoma os genes *agg* e *cylA*, no entanto o gene *esp* estava presente em 19% dos isolados e *gelE* em 26%.

Em suma, os resultados deste estudo comprovam que cada queijo analisado possui uma microbiota autóctone característica e relevante para as propriedades do produto final. Relativamente ao seu potencial de patogenicidade, foram identificados isolados resistentes a alguns antibióticos de importância clínica, sendo ainda identificada, capacidade hemolítica e proteolítica. O facto de existir apenas um isolado multirresistente diminui o potencial risco associado.

**Palavras chave:** queijo tradicional português; bactérias ácido lácticas; *Enterococcus* spp.; resistência a antibióticos; fatores de virulência

## Abstract

Nisa and Azeitão Portuguese cheeses are products with Protected Designation of Origin (PDO). Although produced in distinct regions, these cheeses share some similarities, such as raw sheep's milk and the type of rennet (*Cynara cardunculus*) in their production process. Lactic acid bacteria (LAB) act on the fermentation and maturation stages of the PDO-Cheese production process, significantly influencing the organoleptic properties of the final product. Despite their many technological advantages, these bacteria can also be responsible for the transference of antibiotic resistance genes or virulence factors.

In this context, this dissertation aimed to characterize lactic acid bacteria (in particular *Enterococcus* spp.) and evaluate the underlying pathogenic potential, by performing phenotypic and genotypic analysis of antibiotic resistance and virulence factors. Also, to compare the results of the current study with those obtained between 2016-18.

In 2019, cheese samples were collected from traditional producers in Azeitão and Nisa used to isolate lactic acid bacteria using different culture mediums. RAPD-PCR technique was applied to assess the microbial diversity of the isolates. Then, the profiles obtained were analyzed to create dendrograms. From this analysis it was possible to evaluate the genomic similarity between the isolates, to choose representative isolates, and to calculate diversity indexes.

Data analysis for the two types of cheese revealed that *Lactococcus* spp. is the predominant genera and *Enterococcus* spp., despite being in a smaller number, shows high genomic diversity. These conclusions are in agreement with the results obtained in previous years (2016-18).

Further analysis of the isolated enterococci showed that *E. faecalis* is the predominant species, followed by *E. faecium* and *E. durans*.

Regarding the resistance to antibiotics, which was studied using disc diffusion and multiplex PCR techniques, several differences were found in the number of isolates resistant when compared to previous years. *Enterococcus* spp. showed to be resistant to the majority of antibiotics and a multidrug-resistant isolate was also identified.

Regarding the resistance genes investigated, the study concluded that 100% of the tetracycline-resistant isolates harbor the *tet*(M) gene, 67% of the erythromycin-resistant isolates possess *erm*(B) gene, and, finally, the vancomycin-resistant isolate does not carry the *van*(A) or *van*(B) genes. Concerning the search for virulence factors, it was found that 26% of the isolates had a positive activity for hemolysis, a much higher percentage obtained than in previous years, 45% of the isolates showed positive results for the production of gelatinase and 40% showed proteolytic activity. For the virulence genes studied, none of the isolates had *agg* and *cylA* genes in its genome, however, the *esp* gene was present in 19% and *gelE* in 26% of the isolates.

In conclusion, the results of this study have shown that each analyzed cheese has a specific characteristic microbiota, which is relevant to the organoleptic characteristics of the final product. Regarding the pathogenic potential, we identified several isolates that are resistant to a significant number of antibiotics with clinical importance, hemolytic, and proteolytic activity. The fact that there was only one multidrug-resistant isolate decreases the putative risk associated.

**Keywords:** Portuguese artisanal cheese; lactic acid bacteria; *Enterococcus* spp.; antibiotic resistance; virulence factors

## Índice

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| <b>1</b>  | <b>Introdução .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b>  | <b>Caracterização do queijo .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1.1   | Principais aspetos e processamento .....  | 1         |
| 1.1.2   | Queijos com Denominação de Origem Protegida de Azeitão e Nisa .....                     | 2         |
| 1.1.3   | Bactérias ácido lácticas.....   | 3         |
| 1.1.3.1   | Características gerais .....  | 3         |
| 1.1.3.2   | A dupla face dos <i>Enterococcus</i> .....  | 5         |
| 1.1.3.3   | <i>Fingerprinting</i> e identificação das bactérias ácido lácticas .....                | 5         |
| 1.1.3.4   | Resistência a antibióticos .....  | 6         |
| 1.1.3.5   | Fatores de virulência .....   | 8         |
| <b>1.2</b>  | <b>Objetivos deste estudo.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2</b>  | <b>Materiais e Métodos .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2.1</b>  | <b>Microbiologia convencional.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2.2</b>  | <b>Métodos moleculares.....</b>   | <b>11</b> |
| 2.2.1   | Extração de DNA .....   | 11        |
| 2.2.2   | Análise da diversidade genómica .....   | 11        |
| 2.2.2.1   | RAPD-PCR .....  | 11        |
| 2.2.2.2   | Análise de dados.....   | 11        |
| 2.2.3   | Identificação ao nível de género e espécie .....  | 12        |
| <b>2.3</b>  | <b>Avaliação da resistência a antibióticos .....</b>                                    | <b>13</b> |
| 2.3.1   | Antibiogramas .....   | 13        |
| 2.3.2   | Pesquisa de genes de resistência.....   | 14        |
| <b>2.4</b>  | <b>Avaliação da presença de fatores de virulência .....</b>                             | <b>14</b> |
| 2.4.1   | Testes fenotípicos .....  | 14        |
| 2.4.2   | Testes genotípicos .....  | 15        |
| <b>3</b>  | <b>Resultados e Discussão.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Microbiologia convencional: Comparação entre queijarias e anos de produção .....</b> | <b>17</b> |
| <b>3.2</b>  | <b>Métodos moleculares.....</b>   | <b>20</b> |
| 3.2.1   | Avaliação da diversidade microbiana.....  | 20        |
| 3.2.1.1   | Comparação entre os diferentes anos de produção.....                                    | 21        |
| 3.2.1.2   | Comparação entre queijarias .....   | 23        |
| 3.2.2   | Identificação do género e da espécie .....  | 25        |
| <b>3.3</b>  | <b>Avaliação do potencial patogénico .....</b>  | <b>25</b> |
| 3.3.1   | Resistência aos antibióticos.....   | 25        |
| 3.3.2   | Fatores de virulência .....   | 30        |
| <b>4</b>  | <b>Conclusões.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>5</b>  | <b>Referências bibliográficas.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>Apêndice A - Dendrogramas utilizados na análise de diversidade e na escolha dos representantes</b> |   |           |
| <b><i>Enterococcus spp.</i>.....</b>  |   | <b>42</b> |
| <b>Apêndice B – Dendrogramas dos isolados <i>Enterococcus spp.</i>.....</b>                           |   | <b>46</b> |

### Lista de figuras e tabelas:

Tabela 2.1: Condições e meios de crescimento.

Tabela 2.2: Informações sobre os *primers* utilizados para confirmação do género *Enterococcus* e identificação da espécie.

Tabela 2.3: Antibióticos utilizados, respetivas classes e alvos.

Tabela 2.4: Informações sobre os *primers* utilizados para pesquisa dos genes de resistência.

Tabela 2.5: Informações sobre os *primers* utilizados para pesquisa dos genes de virulência.

Tabela 3.1: Valores dos índices de diversidade calculados para as diferentes queijarias em anos diferentes de produção (2016-19).

Figura 3.1: Contagens de unidades formadoras de colónias de BAL isoladas em meio MRS (2016-19).

Figura 3.2: Contagens de unidades formadoras de colónias de *Lactococcus* em meio M17 (2016-19).

Figura 3.3: Contagens de unidades formadoras de colónias de *Enterococcus* em meio SBA (2016-19).

Figura 3.4: Dendrograma de *Enterococcus* isolados da queijaria A3.

Figura 3.5: Dendrograma de *Enterococcus* isolados da queijaria N9.

Figura 3.6: Frequência de isolados resistentes por queijarias e antibióticos utilizados, segundo os valores de EUCAST.

Figura 3.7: Frequência de isolados resistentes por queijarias e antibióticos utilizados, segundo os valores de CLSI.

Figura 3.8: Análise da atividade fenotípica de fatores de virulência.

Figura 3.9: Resultados da análise de genes de virulência por queijaria.

# 1 Introdução

## 1.1 Caracterização do queijo

### 1.1.1 Principais aspetos e processamento

O termo “queijo” designa um grupo de produtos alimentares à base de leite fermentado (Fox et al., 2004), apresentando-se este, como o mais diversificado e consumido no mundo, relativamente aos restantes grupos de produtos lácteos. Sendo, sem dúvida, o mais interessante para ser estudado (Fox and Cogan, 2004; Tilocca et al., 2020).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (códex standart 283-1978) o queijo pode ser um produto maturado ou não maturado, de pasta extra-dura, dura, semi-dura, ou mole, podendo ser revestido.

É obtido através da coagulação, total ou parcial, da proteína do leite (integral, parcial ou totalmente desnatado), de soros lácteos, natas, leitelho ou qualquer combinação destes, coagulados pela ação do coalho ou de outros agentes coagulantes apropriados. Posteriormente, à drenagem parcial do soro resultante da coagulação resulta num aumento da concentração da proteína láctea o que, por consequência, faz com que o conteúdo em proteína do queijo seja superior ao nível proteico dos produtos lácteos mencionados anteriormente.

O queijo contém uma elevada concentração de nutrientes essenciais, em relação ao seu nível de energia. A quantidade de nutrientes é influenciada pelo tipo de leite utilizado, modo de fabrico e grau de maturação. A sua proteína é quase 100% digerível, uma vez que na fase de maturação, do seu fabrico, já há uma degradação progressiva da caseína em péptidos solúveis, em água e aminoácidos livres (O'Brien and O'Connor, 2017).

Inicialmente, o objetivo principal do fabrico do queijo veio da necessidade de se conservarem os principais constituintes do leite. No entanto, hoje em dia o fabrico e consumo do queijo tornou-se altamente apreciado e valorizado em todo o mundo (Fox et al., 2004).

Os primeiros laticínios fermentados foram produzidos por combinação ao acaso de reações feitas por um grupo de bactérias, as bactérias do ácido láctico (BAL), que crescem no leite e produzem ácido suficiente para reduzir o pH do leite até ao ponto isoelétrico. No fabrico do queijo o coalho utilizado pode ser de origem animal ou vegetal. Dos coalhos vegetais o mais usado nos queijos artesanais em Portugal, como o de Serpa e da Serra, é o extrato de *Cynara cardunculus* (cardo), constituído pela enzima cinarase (Fox et al., 2004).

A produção de queijo de boa qualidade depende da qualidade do leite do ponto de vista químico, bioquímico e microbiológico. O leite cru é uma matéria prima bastante variável e está sujeito a uma série de processos que visam modificar, padronizar e otimizar as propriedades de produção de queijo (Fox and Cogan, 2004).

O leite pode ser contaminado por microrganismos patogénicos e isso, claramente, é uma grande preocupação. Os patogéneos presentes no leite são normalmente *Listeria monocytogenes*, estirpes enterotoxigénicas de *E. coli*, *Shigella*, *Erwinia*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Mycobacterium paratuberculosis*. No queijo, esses podem morrer sob condições hostis: um pH relativamente baixo (5,3), um teor relativamente elevado de sal, ou devido à presença de bacteriocinas (Fox and Cogan, 2004).

Contudo, alguns dos microrganismos presentes no leite cru, especialmente as bactérias lácticas, contribuem positivamente para o sabor do queijo. É geralmente aceite que o sabor do queijo fabricado com leite cru é mais intenso e mais variado que o queijo produzido com leite pasteurizado (Fox and Cogan, 2004; Macedo et al., 2004).



### 1.1.2 Queijos com Denominação de Origem Protegida de Azeitão e Nisa

De acordo com o Regulamento Europeu 510/06, a designação de queijo com Denominação de Origem Protegida (DOP) pressupõe que exista uma ligação entre a área de origem, os procedimentos tradicionais de fabrico e as características específicas do produto final. Tendo em conta os fatores anteriores, é interessante destacar a influência que a população microbiana, composta principalmente por BAL, que está presente naturalmente no leite cru, tem nas características sensoriais e na textura das diferentes variedades de queijo (Franciosi *et al.*, 2009; Randazzo *et al.*, 2009).

Alguns países europeus criaram a DOP, não só para a proteção legal, mas também com o intuito de promover a aplicação de padrões de alta qualidade a produtos alimentícios selecionados.

Portugal foi um dos países que implementou a DOP e no caso específico dos queijos tradicionais DOP, efetuou uma divisão em cinco grupos, tendo por base a distinção dos diferentes produtos segundo dois parâmetros: origem do leite e tipo de coalho utilizado. Nesse sentido, temos os queijos de Azeitão, Castelo Branco, Évora, Nisa, Serpa e Serra da Estrela são feitos com leite de ovelha cru, coalhado com cardo (*Cynara spp.*). Já o queijo Terrincho é feito com leite de ovelha cru e utiliza o coalho animal. O queijo de cabra Transmontano é feito com leite de cabra e utiliza o coalho animal. O amarelo e picante da Beira Baixa e o queijo Rabaçal utilizam uma mistura de leite de ovelha e cabra e o coalho animal e por último os queijos São Jorge e Pico são produzidos com leite de vaca cru e coalho animal (Freitas *et al.*, 2000).

Estes produtos lácteos tradicionais têm elevada importância devido às suas características organoléticas únicas, juntamente com impactos sociais e económicos há muito reconhecidos, que se traduzem na manutenção do emprego local e na retenção de famílias de agricultores, em regiões periféricas e desérticas (Freitas *et al.*, 2000).

Dos queijos tradicionais Portugueses com DOP serão estudados no presente trabalho os de Azeitão e Nisa, cujas características específicas são seguidamente mencionadas.

A produção do queijo de Azeitão DOP começa com a filtração do leite cru de ovelha e a adição de coalho vegetal (*Cynara Cardunculus L.*). De seguida, o leite é armazenado à temperatura de 30°C, durante 45 min. Terminada a coagulação, o excesso de soro é retirado manualmente, ficando uma massa comprimida que permanece 20 dias na casa de “enxugo” à temperatura de 10-12°C e humidade relativa de 85 a 90%.

O resultado é um queijo curado, de pasta semi-mole e amanteigada, de cor branca ou ligeiramente amarelada, possui sabor picante e, simultaneamente, acidificado e salgado. As suas características organoléticas devem-se, por um lado, às condições climáticas da região, que influenciam a qualidade dos pastos, por outro à utilização de uma variedade de flor de cardo espontânea, como coagulante. A área geográfica de produção abrange os concelhos de Palmela, Sesimbra e Setúbal (<https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/> Consultado a 5 de maio de 2020).

O fabrico do queijo de Nisa DOP começa pela adição do coalho (*Cynara Cardunculus L.*) ao leite de ovelha à temperatura de 25 a 28°C, durante 45 a 60 min. Após este processo, ocorre o primeiro corte da coalhada, de forma a remover parte do soro. De seguida, transfere-se a coalhada para os cinchos, dando-se a mexedura manual e a salga.

Por último, ocorre a maturação que compreende 2 fases: a primeira tem a duração de 15 a 18 dias e ocorre à temperatura de 8 a 10°C, com humidade relativa de 80 a 90%, enquanto que a segunda dura 30 a 40 dias e ocorre à temperatura de 10 a 14°C e a uma humidade relativa de 85 a 90%.

O queijo de Nisa DOP é conhecido desde longa data na região do Alentejo. É obtido a partir de leite cru de ovelha, da raça regional Merina Branca. Trata-se de um queijo curado, de pasta semi-dura e cor branca amarelada, possui sabor ligeiramente ácido e aroma intenso.

É produzido em Nisa, Crato, Castelo de Vide, Marvão, Portalegre, Monforte, Arronches e Alter do Chão, no distrito de Portalegre (<https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/> Consultado a 5 de maio de 2020).

### 1.1.3 Bactérias ácido lácticas

#### 1.1.3.1 Características gerais

As BAL formam um grupo heterogéneo de bactérias, tendo em comum várias características, entre elas, a capacidade de fermentar açúcares, como a lactose, para formar ácido láctico. São caracterizadas por serem Gram-positivas, catalase-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbicas facultativas, e com baixo percentagem de G+C. Já a heterogeneidade desse grupo bacteriano é bem demonstrada através da grande diversidade das suas características morfológicas, uma vez que, podem apresentar forma de bastonetes ou cocos, podem surgir como células isoladas ou em conjuntos de células, tétradas e cadeias curtas ou longas (Gomes *et al.*, 2015; Settanni and Moschetti, 2010). São normalmente encontradas em matérias-primas de origem animal e vegetal, produtos alimentícios fermentados, pele de animais e no trato gastrointestinal humano e de muitos animais (Clementi and Aquilanti, 2011).

Os principais géneros pertencentes a este grupo de bactérias são: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (Makarova *et al.*, 2006).

Entrando agora no fabrico dos queijos, as BAL desempenham diversas funções. Algumas participam no processo de fermentação, enquanto que outras estão envolvidas na maturação do queijo, onde são aproveitadas as vantagens da microbiota secundário (Meng *et al.*, 2018). No primeiro caso, as BAL fermentam a lactose produzindo rapidamente altas concentrações de ácido láctico, designando-se como bactérias ácido lácticas *starter* (BALS). No segundo caso, as BAL responsáveis pelo processo de maturação, designam-se por bactérias ácido lácticas não *starter* (BALNS) (Settanni and Moschetti, 2010). Normalmente, as BALNS crescem após a salga do queijo (Meng *et al.*, 2018).

De acordo com os produtos finais formados durante a fermentação da glucose, as BAL podem ser divididas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas. As primeiras produzem ácido láctico, como produto final da fermentação da glucose. Por outro lado, as heterofermentativas têm como produtos finais da fermentação da glucose, ácido láctico, dióxido de carbono e etanol (Caplice and Fitzgerald, 1999). Devido às suas propriedades metabólicas, as BAL contribuem significativamente para o sabor, textura, valor nutricional e segurança microbiana dos alimentos fermentados (Herreros *et al.* 2003) (Parente, Cogan, and Powell, 2004; Porto *et al.*, 2016).

No caso específico do sabor do queijo, este é influenciado pela ação de diversas enzimas libertadas pela microbiota autóctone. As enzimas vão ser fundamentais na degradação dos péptidos e da caseína, obtendo-se aminoácidos livres, importantes para o sabor característico do queijo, por serem precursores de outras reações catabólicas originando componentes voláteis (Settanni and Moschetti, 2010).

Um outra contribuição das BAL, é a competitividade contra bactérias patogénicas através da produção de bacteriocinas, péptidos antimicrobianos específicos, que vão reduzir o risco de crescimento e sobrevivência de patógenos e de microrganismos responsáveis pela deterioração de alimentos, podendo ser, as espécies pertencentes aos géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Salmonella* (Devirgiliis *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2016; Soomro *et al.*, 2002). Estas bactérias libertam também, outros metabolitos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, que ao provocarem uma acidificação rápida do meio, evitam o crescimento de muitos microrganismos não favoráveis, durante a fermentação.

A "biodiversidade" das BAL envolvidas na produção dos queijos, é considerada um fator fundamental para as características e qualidade dos produtos artesanais. Já foram feitos diversos estudos

em que o foco central foi a caracterização das BAL associadas a queijos (Franciosi *et al.*, 2009). Esses estudos foram feitos em muitos produtos, nomeadamente em queijos de Itália (Dolci *et al.*, 2008, 2010; Fontana *et al.*, 2010; Pogačić *et al.*, 2013); Grécia (Gantzias *et al.*, 2020); Colômbia (Zapata *et al.*, 2017); Espanha (Cabezas *et al.*, 2007; Herreros *et al.*, 2003; Arribas *et al.*, 2011); México (Caro *et al.*, 2020); Turquia (İspirli *et al.*, 2017) e Irlanda (Fitzsimons *et al.*, 1999).

Um exemplo mais concreto desses estudos, foi o realizado com queijos tradicionais da Grécia, produzidos na ilha de Naxos. Os autores utilizaram a técnica MALDI-TOF MS e uma base de dados para identificarem 88 BALNS, isoladas de 18 amostras de quatro queijos diferentes, obtidos a partir de leite cru de ovelha e cabra, sem a adição de culturas *starter*. Neste estudo concluíram que havia uma elevada variedade de espécies entre os quatro tipos de queijo, mas que as espécies mais frequentes eram *Lactobacillus brevis* e *L. plantarum*, ambas pertencentes ao grupo das BAL (Gantzias *et al.*, 2020).

Muitos estudos semelhantes foram realizados com queijos tradicionais portugueses, referenciando primeiro o queijo do Pico DOP. Um queijo curado, de pasta semi-mole, obtido a partir de leite de vaca cru coalhado com coalho animal. Neste estudo, foi realizada a pirosequenciação da região V3-V4 do rDNA 16S, tendo sido concluído que havia uma elevada diversidade de bactérias. Identificaram um conjunto de géneros, tais como, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Pantoea*, sendo o género *Lactococcus* o predominante (Riquelme *et al.*, 2015).

Um segundo estudo que gostaria de evidenciar, é o do queijo Serpa, considerado um dos queijos tradicionais portugueses mais populares devido às suas características, como o sabor e o aroma. Para a sua produção é utilizado leite de ovelha cru e extrato de *Cynara cardunculus* como coagulante e não há adição de culturas *starter*. Neste estudo, utilizaram sequenciação do gene rDNA 16S chegando à conclusão que o género predominante presente no queijo Serpa era *Lactococcus* (40-60% da população), seguindo pelos géneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (Gonçalves *et al.*, 2018).

O terceiro estudo a mencionar, foi o realizado com o queijo São Jorge DOP. É um queijo semiduro, igualmente produzido com leite de vaca cru. Neste trabalho foram utilizados métodos fenotípicos e genótipos com o objetivo de identificar as BAL dominantes neste tipo de queijo. Foram identificados 225 isolados ao nível do género, estando representados da seguinte maneira: 41% *Lactobacillus*, 40% *Enterococcus*, 7% *Leuconostoc*, 5% *Pediococcus* e 4% *Lactococcus* (Kongo *et al.*, 2007).

Por último é de referir três estudos que tiveram como objetivo o estudo dos queijos de Nisa e Azeitão, que são queijos produzidos como leite de ovelha cru e utilizam o cardo (*Cynara cardunculus*) como coagulante. Segundo a dissertação (Batista, 2017), que utilizou a sequenciação das regiões V1-V3 do rRNA 16S e, posteriormente, para confirmar os resultados obtidos e para identificar algumas espécies bacterianas, foram realizados PCR com *primers* específicos ao nível de género e espécie. No final foi concluído que os géneros representantes eram: *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* e as espécies dominantes *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* e *E. faecalis*. Numa outra dissertação (Ruivo, 2018), utilizando igualmente a técnica de sequenciação do gene rRNA 16S observou-se que os géneros predominantes foram igualmente *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. O terceiro estudo, (Rocha, 2019) através da técnica PCR-multiplex, com o auxílio de *primers* específicos ao nível da espécie, concluiu que no género *Enterococcus* as espécies predominantes eram *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans*.

Em suma, observando todos os resultados dos diferentes estudos abordados anteriormente, independentemente do tipo de queijo e dos métodos utilizados para a identificação das bactérias presentes, pode-se concluir que os géneros dominantes são *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*; todos pertencentes ao grupo das BAL (Meng *et al.*, 2018; Parente *et al.*, 2004; Porto *et al.*, 2016). Destes, o género *Enterococcus* é o mais controverso, como irá ser descrito a seguir.

### 1.1.3.2 A dupla face dos *Enterococcus*

Na produção de queijo, principalmente os que são produzidos no sul da Europa de forma tradicional, (Giraffa 2003) as espécies de *Enterococcus* desempenham papéis importantes durante o período de maturação, sendo responsáveis pelo desenvolvimento das características organoléticas típicas (Barbosa *et al.*, 2014; İspirli *et al.*, 2017).

Os *Enterococcus* encontram-se no processo de fermentação, uma vez que estão presentes no trato gastrointestinal de seres humanos e animais de sangue quente (Barbosa *et al.*, 2014; İspirli *et al.*, 2017) e facilmente se disseminam para o meio ambiente, especialmente para matérias primas como o leite (İspirli *et al.*, 2017). Além disso, podem estar presentes em amostras de queijo produzido a partir de leite cru (McAuley *et al.*, 2015) e pasteurizado devido à sua elevada resistência térmica. Além das funções fermentativas dos *Enterococcus*, a produção de enterocinas, que fazem parte das bacteriocinas, é uma importante característica dos membros deste género, pois pode resultar na inibição de certos patógenos, durante o período de fermentação e maturação de queijo e outros produtos alimentares (İspirli *et al.*, 2017).

No entanto, o género *Enterococcus* é considerado dos principais microrganismos causadores de doenças em ambiente hospitalar e parecem ter uma resistência antimicrobiana crescente (Wierzychowska *et al.*, 2020; Moreno *et al.*, 2006). Os isolados provenientes de ambientes hospitalares são considerados mais patogénicos que estirpes de *Enterococcus* isoladas a partir de alimentos (Perin *et al.*, 2014). A caracterização destes como patógenos oportunistas deve-se às características de aquisição e transferência de genes codificadores de fatores virulência e de resistência a múltiplos antibióticos (Porto *et al.*, 2016). Uma ameaça ainda maior é a possibilidade de transferência da resistência à vancomicina para *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, tal como já foi descrito no nosso país (Friães *et al.*, 2015).

Ao longo dos anos, *Enterococcus* spp. que apresentavam características de virulência e antibiorresistência, ao contrário da maioria das restantes BAL, foram isolados de diversas fontes alimentares (Santos *et al.*, 2017).

Os *Enterococcus* mais comuns nas variedades de queijos tradicionais produzidos com leite cru ou pasteurizado, de cabra ou ovelha, pertencem às espécies *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* (Arizcun *et al.*, 1997; Gaglio *et al.*, 2016).

### 1.1.3.3 *Fingerprinting* e identificação das bactérias ácido lácticas

A introdução de técnicas de biologia molecular produziu uma variedade de métodos de *fingerprinting* baseados na análise do DNA, que podem até discriminar entre isolados de uma dada espécie.

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) tem vindo a ser um método muito usado ao longo dos anos, a característica marcante do PCR é a capacidade de produzir milhões de cópias de um determinado segmento de DNA com alta eficiência dentro de 3 ou 4 horas (Tenover *et al.*, 1997).

Entre as técnicas de *fingerprinting*, baseadas em PCR, *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD-PCR) é a técnica mais comumente aplicada à caracterização da microbiota dos produtos lácticos (Busta *et al.*, 2006).

RAPD-PCR baseia-se no uso de um *primer*, com uma sequência curta e aleatória, apresentando 9-10 bases de comprimento, que hibrida com afinidade suficiente em vários locais do genoma, a baixas temperaturas de hibridação. A hibridação do *primer* com o genoma em estudo resultará num produto de PCR, o número de amplicões de cada genoma vai depender da eficiência de hibridação do *primer*, isto

porque pode haver variações no grau de homologia entre o *primer* e a sequência do DNA molde. Se o número e a localização dos sítios de ligação variarem para diferentes estirpes, o padrão de bandas gerado, será característico de uma determinada estirpe bacteriana (Busta *et al.*, 2006).

Num estudo prévio de queijo artesanal Oaxaca os autores utilizaram RAPD-PCR para a caracterização de estirpes de *Lactococcus*, com o auxílio dos *primers* OPA18 (5'-AGGTGACCGT-3') e M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3), foram obtidos perfis de *fingerprinting*, utilizados para selecionar estirpes candidatas ao delineamento de uma cultura *starter* adequada para fabrico de queijo Oaxaca (Caro *et al.*, 2020).

No caso de um estudo realizado em queijo Grana Padano DOP de Itália, um queijo maturado duro de leite de vaca cru. O objetivo foi explorar a diversidade e a dinâmica a longo prazo de estirpes BAL autótones, sendo que a técnica utilizada foi RAPD-PCR. Concluíram que as espécies predominantes eram: *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. e* *Pediococcus acidilactici* (Pogačić *et al.*, 2013).

Outra técnica baseada no uso do PCR, para amplificar diversas sequências de DNA simultaneamente é o *PCR-Multiplex*. Este processo permite amplificar o DNA presente nas amostras, utilizando vários *primers* e uma DNA polimerase. Os *primers* utilizados têm que ser desenvolvidos de maneira que possam funcionar à mesma temperatura de hibridação durante o PCR. Esta técnica é utilizada para a rápida identificação de BAL, presentes em produtos lácticos, e também para a detecção de genes específicos que codificam para características particulares, como genes de virulência e de resistência a antibióticos (Busta *et al.*, 2006).

Em estudos prévios (Jackson *et al.*, 2004), recorreram à combinação de *primers* específicos para género e espécie, usando a técnica *PCR-Multiplex*, para permitir a identificação de *Enterococcus*. Conseguindo assim a identificação simultânea ao nível do género e de 23 espécies, utilizando sete combinações distintas de *primers*.

#### 1.1.3.4 Resistência a antibióticos

A resistência a antibióticos é uma característica dos microrganismos, que resulta da capacidade adaptativa perante circunstâncias adversas. Corresponde à capacidade de sobreviver e crescer na presença de uma molécula que normalmente as mataria ou limitaria o seu crescimento (Fraqueza, 2015; Rojas *et al.*, 2013).

Uma das principais fontes de transmissão da resistência a antibióticos das populações bacterianas de animais para humanos é a cadeia alimentar (Franz *et al.*, 2011). Entre os vários alimentos destacam-se os produtos lácteos fermentados, que não são tratados termicamente antes de serem consumidos. Constituem assim, um veículo para as bactérias resistentes a antibióticos entre a microbiota autóctone animal e a microbiota do trato gastrointestinal humano (Mathur and Singh, 2005), o que é uma grande preocupação na segurança alimentar (Devirgiliis *et al.*, 2013; Marshall *et al.*, 2009).

As BAL apresentam um longo historial de segurança alimentar, tendo adquirido o estatuto *Qualified Presumption of Safety* (QPS) atribuída pela Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (EFSA). A maioria das BAL são consideradas suscetíveis à grande parte dos antibióticos usados, sendo a resistência à tetraciclina a encontrada com maior frequência, seguida pela resistência a aminoglicosídeos (Ferrer *et al.*, 2015; Rossetti *et al.*, 2009).

Em contraste com a maioria das bactérias do ácido láctico, o género *Enterococcus* não é considerado QPS. Contudo são considerados úteis na produção de queijos e carnes fermentadas (Franz *et al.*, 2011; Ogier and Serror, 2008), ocupando assim uma posição peculiar entre os microrganismos alimentares (Clementi and Aquilanti, 2011).

A resistência das bactérias a um dado antibiótico, pode ser de natureza intrínseca ou adquirida. Deve ser considerada intrínseca, quando é inerente a uma espécie bacteriana, estando presente em todas

as suas estirpes. Na maioria dos casos deve-se, à presença de alvos com baixa afinidade aos antibióticos ou à sua ausência, à produção inata de enzimas que inativam o fármaco ou à inacessibilidade do fármaco à célula bacteriana, por diminuição da captação do mesmo (Kumar and Schweizer, 2005). A resistência intrínseca apresenta um potencial reduzido para transferência horizontal, entre diferentes espécies bacterianas, como foi demonstrado, por exemplo, com a resistência cromossômica à vancomicina na estirpe *Lactobacillus rhamnosus* GG (Tynkkynen *et al.*, 1998).

Os *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a alguns antibióticos podendo acumular mutações e genes exógenos, que podem resultar em resistências adicionais (Russo *et al.*, 2018a). Têm sido descritas diversas resistências intrínsecas a várias classes de antibióticos, como aos  $\beta$ -lactâmicos, cefalosporinas, aminoglicosídeos e lincosamidas (Hollenbeck and Rice, 2012).

Por outro lado, a resistência é considerada adquirida, se a estirpe de uma dada espécie suscetível se torna resistente a um determinado antibiótico. Isto pode acontecer devido à aquisição de genes (genes adquiridos pelas bactérias através do ganho de DNA exógeno, troca de genes entre bactérias) ou por mutação gênica (Kumar and Schweizer, 2005).

A análise de espécies microbianas presentes em queijo revelou vários casos de transferência horizontal de genes em BAL, como *Lactobacillus* e *Lactococcus*. São bactérias importantes na fermentação do leite, que contêm alguns genes de resistência a antibióticos, podendo atuar como reservatório para *Enterococcus* (Bonham *et al.*, 2017).

De forma equivalente à resistência intrínseca, a resistência adquirida apresenta um risco baixo de disseminação horizontal, quando resulta de uma mutação cromossômica. No entanto, considera-se que a resistência adquirida tem elevado potencial de transferência horizontal, quando os genes de resistência estão presentes em elementos móveis, como plasmídeos e transposões, podendo constituir uma ameaça à saúde pública (Fraqueza, 2015).

A utilização em larga escala de antibióticos em humanos, na medicina veterinária e na agricultura, são apontadas como principais causas do aumento da taxa de bactérias resistentes, tendo um papel relevante no crescimento do número de genes de resistência em reservatórios ambientais (Franz *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2013).

O número de estirpes resistentes tem vindo a aumentar nas comunidades sensíveis, devido à pressão seletiva. Nesse sentido, a emergência de novas estirpes resistentes aos antibióticos é regularmente relatada, logo após a introdução de novos antibióticos (Clementi and Aquilanti, 2011). A pressão seletiva de um antibiótico específico pode induzir resistência a outros compostos da mesma classe e/ou a classes diferentes, mas que compartilhem o mesmo alvo (Clementi and Aquilanti, 2011). Além disso, a capacidade adaptativa das bactérias está em constante evolução, aumentando a probabilidade do surgimento de uma nova resistência (Clementi and Aquilanti, 2011).

A resistência aos antibióticos, e em particular a multirresistência (resistência a pelo menos um antibiótico de três classes com alvos diferentes, segundo (Magiorakos *et al.*, 2012)), é um grave problema de saúde pública. Tem causado transtornos na eficiência nos tratamentos das infeções causadas por *Enterococcus*, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Sendo dada especial atenção à resistência à vancomicina e teicoplanina, por serem antibióticos de última linha no tratamento de infeções hospitalares (Giraffa, 2002; Golob *et al.*, 2019; Kayser, 2003). O artigo (Wierzchowska *et al.*, 2020) mostrou que os *Enterococcus* presentes em produtos lácticos apresentavam várias resistências aos antibióticos que são normalmente utilizados no tratamento de infeções causadas pelos mesmos.

Embora exista alguma variação, diversos estudos mostram que a espécie *E. faecalis* seguida por *E. faecium*, são as mais prováveis de serem potencialmente patogénicas e prejudiciais à saúde (Russo *et al.*, 2018a).

#### 1.1.3.5 Fatores de virulência

Os fatores de virulência contribuem para a severidade das infecções e são uma grande preocupação quando presentes nos *Enterococcus* por terem uma maior capacidade para expressar genes com potencial patogénico (Perin *et al.*, 2014).

Algumas espécies pertencentes ao género *Enterococcus* estão associadas a infecções hospitalares, as quais podem ser transmitidas de pessoa para pessoa e através de superfícies contaminadas, causando doenças em humanos, como infecções do trato urinário, abdómen, pélvis, endocardite, bacteremia e no sistema nervoso central. Estas estirpes patogénicas, geralmente, transportam múltiplas resistências a antibióticos e fatores de virulência, como adesinas, fatores secretados e feromonas sexuais (Golob *et al.*, 2019; Pieniz *et al.*, 2015; Porto *et al.*, 2016).

Dentro dos determinantes de virulência associados à patogenicidade destaca-se a produção de hemolisina/citolisina (genes *cylR1*, *cylR2*, *cylL1*, *cylLs*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylI*), gelatinase (gene *gelE*), proteínas de superfície (gene *esp*), adesina da parede celular (gene *efaA*), adesina do colagénio (gene *ace*) e substância de agregação (gene *agg*) (Wierzchowska *et al.*, 2017; Porto *et al.*, 2016).

O primeiro fator de virulência a ser estudado no género *Enterococcus* foi detetado devido à sua capacidade hemolítica. É geralmente designado como citolisina, por apresentar uma ampla gama de células alvo, que pode incluir tanto células eucariotas, como procarióticas (Santos, *et al.*, 2003). É considerado uma proteína-toxina que causa reações  $\beta$ -hemolíticas em eritrócitos de humanos, coelhos e cavalos (Santos, *et al.*, 2003). De acordo com um estudo anterior (Porto *et al.*, 2016) foi observada a produção de hemolisina em todos os isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de queijos tradicionais produzidos no Brasil, embora os resultados variem de acordo com a origem do sangue utilizado como suplemento ao meio de cultura usado no teste.

A citolisina desempenha um papel importante na virulência dos *Enterococcus*, pois pode aumentar a gravidade das infecções. A produção de citolisina é regulada por um operão constituído por oito genes: *cylR1*, *cylR2*, *cylL1*, *cylLs*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylI*. O operão pode estar localizado em regiões como plasmídeos que respondem a feromonas, como por exemplo, o pAD1, ou por ilhas de patogenicidade cromossómicas (Wierzchowska *et al.*, 2017; Porto *et al.*, 2016).

Outro dos fatores de virulência mais bem estudados em *Enterococcus* é a gelatinase. Esta é uma metaloendopeptidase extracelular dependente de zinco. É uma enzima capaz de hidrolisar gelatina, elastina, colagénio, hemoglobina, bem como outros péptidos bioativos, sugerindo a sua participação na iniciação da propagação do processo inflamatório (Lopes *et al.*, 2006; Sedgley, 2007). A gelatinase é codificada pelo gene *gelE*, que por sua vez é controlado pela proteína transmembranar *FsrB*, que é regulada pelo locus *fsr*, constituído por três genes: *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2017).

Uma das maiores preocupações relacionadas com a virulência em *Enterococcus*, é a sua capacidade de troca de genes por transferência horizontal. Esse processo é conhecido por ocorrer no trato gastrointestinal, como mencionado anteriormente (Tracy and Gasson, 2001), podendo também ocorrer em produtos alimentares, representando um risco para os consumidores (Perin *et al.*, 2014).

Estudos acerca da incidência de fatores de virulência em enterococos de diferentes origens, mostrou que isolados provenientes dos alimentos também podem apresentar fatores de virulência e resistências a antibióticos. Geralmente, a ocorrência de determinantes de virulência parece ser superior em *E. faecalis*, em comparação com *E. faecium* de origem alimentar, não sendo exclusivo de isolados de origem clínica (Franz *et al.*, 2001; Gaglio *et al.*, 2016). Perante essa situação, têm sido realizados diversos estudos para pesquisar fatores de virulência em *Enterococcus* provenientes de alimentos.

Neste âmbito, um estudo anterior (Santos *et al.*, 2015) mostrou que dos 132 *Enterococcus*, isolados de amostras de alimentos e de superfícies onde os mesmos são processados, 52% eram beta-hemolíticos, 39% eram produtores de gelatinase e todos os isolados continham o gene que codifica para

essa proteína. Em relação à pesquisa dos genes *efaA<sub>fs</sub>*, *agg*, *esp* e *efaA<sub>fm</sub>*, os autores concluíram que o primeiro foi detectado em mais de metade dos isolados (52%) e os restantes em menos de metade dos isolados (25%, 11% e 11% respetivamente). Mostrando assim que os *Enterococcus* isolados de alimentos, podem apresentar fatores de virulência. Tornando-se importante a existência de métodos eficazes para controlar a disseminação de *Enterococcus* com potencial de patogenicidade, conseguindo assim evitar problemas de saúde pública principalmente em indivíduos com um sistema imunológico comprometido.

Um outro estudo (Porto *et al.*, 2016), onde foi estudada a presença de fatores de virulência em *Enterococcus* recolhidos de queijos tradicionais originários do Brasil, mostrou a existência de um perfil de virulência muito variado. Dos 53 *Enterococcus* estudados 90% tinha pelo menos a presença de um dos nove genes estudados. O gene *efaA* foi o que apresentou maior prevalência (70%), seguido do gene *ace* (50%), gene *esp* e gene *gelE* (40%). A produção de hemolisinas foi demonstrada em todos os enterococos em análise.

Um estudo realizado com queijo tradicional de Terrincho, onde se avaliou a segurança dos *Enterococcus* isolados, mostrou que os *E. faecalis* apresentavam a presença dos genes *esp*, *efaA<sub>fs</sub>* e apenas uma estirpe apresentava o determinante *cylL<sub>s</sub>* e outra tinha o gene *cylA*. No entanto, todos os isolados foram negativos para a presença dos genes *cylL*, *cylM*, *cylB* e *agg* (Pimentel *et al.*, 2007).

## 1.2 Objetivos deste estudo

Este estudo teve como objetivo continuar o trabalho experimental, realizado anteriormente por outras três estudantes de mestrado (Batista, 2017; Ruivo, 2018; Rocha, 2019). O primeiro, focado nos aspetos físico-químicos e na caracterização microbiológica de queijos DOP recolhidos em 2016. O segundo, na caracterização microbiológica de isolados de queijos de 2016 e 2017, recorrendo a métodos de microbiologia convencional e metagenómica. O terceiro, baseado na caracterização microbiológica de queijos de 2016, 2017 e 2018 (estudo comparativo) e no potencial patogénico de microrganismos recolhidos de queijos produzidos em 2018.

Nesse contexto, o presente estudo consistiu em avaliar a diversidade microbiana e fazer a identificação de bactérias ácido lácticas presentes em amostras de queijos de Azeitão e Nisa DOP, produzidos em 2019. Posteriormente, realizou-se a avaliação da suscetibilidade a 13 antibióticos e pesquisou-se a presença de fatores de virulência (gelatinase e hemolisina), apenas para os isolados identificados como membros do género *Enterococcus*. Por fim, foi feita a comparação dos resultados obtidos ao longo dos anos 2016-19, para isolados recolhidos de queijos Azeitão e Nisa DOP.



## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Microbiologia convencional

Amostras de queijos DOP, do ano de 2019, foram recolhidas em quatro queijarias de Azeitão e duas de Nisa. A preparação das amostras para as análises microbiológicas consistiu em adicionar 25 g de queijo a 225 mL de Ringer (Oxoid, UK), num saco de *stomacher* e levar ao agitador peristáltico (smomacher Lab-Blender 400) durante 90 s. Para esses 25 g serem uma amostra representativa do queijo em análise, teve-se o cuidado de tirar parte da casca e parte do interior do queijo, fazendo um corte em forma de “fatia de pizza”. A suspensão obtida após homogeneização é considerada a suspensão mãe ( $10^{-1}$ ), sendo utilizada para preparar diluições decimais seriadas (ISSO 6887-5,2010), que foram posteriormente inoculadas em três meios diferentes (SBA, MRS e M17) de acordo com as condições referidas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Condições e meios de crescimento.

| Microrganismo                   | Meio de cultura             | Condições de incubação | Inoculação           |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------|
| <b>Bactérias Ácido Láticas</b>  | Man Rogosa and Sharpe (MRS) | 30°C                   | 0,1 mL na superfície |
|                                 |                             | 72 h                   |                      |
|                                 |                             | (anaerobiose)          |                      |
| <b><i>Lactococcus</i> spp.</b>  | M17                         | 30°C                   | 0,1 mL na superfície |
|                                 |                             | 72 h                   |                      |
|                                 |                             | (anaerobiose)          |                      |
| <b><i>Enterococcus</i> spp.</b> | Slanetz and Bartley (SBA)   | 37°C                   | 0,1 mL na superfície |
|                                 |                             | 48 h                   |                      |

Após crescimentos dos diferentes microrganismos, fez-se a contagem das unidades formadoras de colónias (UFC), considerando apenas as que estavam entre 15 e 150 colónias. Com os dados recolhidos, calculou-se o número de UFCs, para cada meio/amostra, tendo em conta a seguinte fórmula:

$$2.1) \text{ UFC/g} = n^{\circ} \text{ de colónias} \times \frac{1}{\text{diluição}} \times \frac{1}{\text{volume do inóculo}}$$

Posteriormente, repicaram-se aleatoriamente 20% das colónias presentes em cada meio (recorrendo sempre à placa com maior número de colónias contáveis), para placas contendo o mesmo meio de cultura e incubou-se em condições equivalentes às iniciais, com exceção de *Enterococcus* spp. que foram repicados para o meio BHI (Brain Heart Infusion). De seguida, cada colónia foi inoculada num microtubo contendo o mesmo meio, de forma permitir uma conservação prolongada a 4°C, minimizando os riscos de contaminação. Seguidamente, colocou-se na placa de petri, de onde foram repicadas as colónias, 750 µL de solução de Ringer, de forma a suspender todas as células bacterianas presentes. Por último, para se conservar as células microbianas a -80°C recolheu-se 750 µL da suspensão bacteriana para um criotubo que já continha glicerol 40%, obtendo assim uma suspensão bacteriana com glicerol a 20%.

## 2.2 Métodos moleculares

### 2.2.1 Extração de DNA

Procedeu-se ao método da fervura para a extração do material genético dos isolados purificados (Millar et al., 2000). Começou-se por suspender uma colónia em 50 µL de tampão Tris-EDTA com Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1 mM (Sigma-Aldrich, UK) e Tween 20 a 0,1% (v:v) (Frilabo, Portugal). Após esse passo, homogeneizaram-se as amostras que foram submetidas a 100°C durante 10 min e imediatamente colocadas em gelo durante igual período, para que pudesse ocorrer o choque térmico. Por último, centrifugaram-se as amostras a 13000 rpm durante 5 min numa centrífuga Hemle Z233 MK-2 (Hemle, Alemanha) e o sobrenadante recuperado para um novo tubo foi conservado a -20°C até posterior utilização.

### 2.2.2 Análise da diversidade genómica

#### 2.2.2.1 RAPD-PCR

Para a análise do DNA obtido a partir das culturas em estudo, com o objetivo de comparar as diferenças entre isolados recolhidos das várias queijarias e regiões, procedeu-se à técnica de *RAPD-PCR* com os primers GTG<sub>5</sub> (5' GTGGTGGTGGTGGTG3' ) (Švec et al., 2005) , OPC15 (5' GAC GGAT CAG 3') (Aruna et al., 1993) e M13 (5' GAG GGT GGC GGT TCT 3' ) (Cocolin et al., 2004).

As condições de reação para um volume total de 20 µL, foram: 1 µL de *primer* (OPC15, ou M13, a 50 pmol, em reações independentes) (STABVIDA, Portugal), 10 µL de Master Mix Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech, Portugal), e 2 µL de DNA.

A amplificação foi realizada num termociclador Doppio (VWE, EUA). As condições do programa foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min; seguindo-se 40 ciclos de amplificação a 94°C durante 1 min; 40°C durante 2 min; 72°C durante 2 min e alongamento final a 72°C durante 10 min. No final os produtos foram armazenados a 4°C até à eletroforese.

Para a visualização dos perfis de DNA, preparou-se o gel de agarose a 1,2 % com tampão TBE 0,5X, onde se colocou 8 µL de produto de PCR com 2 µL de flurocromo Gelstar 10X (Lonza, EUA). A eletroforese realizou-se em tampão TBE 0.5X a 110 V durante 2 h e 15 min. Seguindo-se a visualização do gel no ChemiDoc XRS+ com o *software ImageLab* (BIO-RAS, EUA).

#### 2.2.2.2 Análise de dados

A análise dos perfis de bandas obtidos foi realizada com recurso ao *software BioNumerics* (versão 6.6.5, Applied Maths, Bélgica). Todos os perfis tiveram de ser normalizados usando o coeficiente de correlação de *Pearson*, para que se conseguisse analisar a semelhança entre os perfis obtidos, e desta forma construir os dendrogramas através do método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA). Para se obter o nível de reprodutibilidade da técnica realizaram-se 10% de réplicas (selecionadas de forma aleatória).

Foram ainda calculados dois índices de diversidade: o índice de Simpson (D) (Hunter and Gaston, 1988) e o de Shannon-Weaver (J') (Tramer 1969). O índice de Simpson mede a probabilidade de dois isolados, selecionados ao acaso, pertencerem ao mesmo grupo genómico ou cluster. No caso deste trabalho vamos medir a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso pertencerem a clusters diferentes, ou seja, vai calcular-se o seu complemento (D'=1-D).

$$2.2) D=1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj - 1)$$

Na fórmula o “N” representa o total de isolados analisados, o “s” representa o número total de grupos formados e o “nj” o número total de isolados em cada grupo.

O índice de Shannon-Weaver permite-nos avaliar a riqueza dos grupos e a uniformidade da abundância, dentro dos diferentes grupos formados. Representa a proporção entre o observado e o máximo de diversidade possível.

$$2.3) H' = \frac{N \log_2 N - \sum_{j=1}^S \log_2 n_j}{N} \quad 2.4) H'_{\max} = \log_2 s \quad 2.5) J' = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

Na fórmula “N” representa o número total de isolados analisados; “s” representa o número total de clusters formados e o “J” a proporção de diversidade observada ao longo da diversidade máxima possível.

### 2.2.3 Identificação ao nível de género e espécie

Para se conseguir a confirmação do género e identificação ao nível de espécie realizou-se um *PCR-Multiplex*. O conjunto de *primers* Ent1 e Ent2, foram utilizados para a confirmação do género (Ke et al. 1999). Para a identificação das espécies, foram utilizados três conjuntos de primers, para identificar três espécies, sendo estas as mais comumente encontradas em queijos tradicionais (Tabela 2.2) (Jackson et al., 2004).

A mistura de reação para um volume total de 20 µL, foi: 3 µL de tampão 5X para a Taq II polimerase (NZYtech, Portugal), 0,2 µL dos *primer* Ent1 e Ent2 a 50 pmol, 0,3 µL de cada um dos restantes primers a 50 pmol, 1,25 MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 0,5 de dNTPs a 10 mM, 1U de NZTYTaq II DNA polimerase e 2 µL de DNA.

Tabela 2.2: Informações sobre os *primers* utilizados para confirmação do género *Enterococcus* e identificação da espécie.

| Alvo                     | Primers | Sequência                      | Tamanho do produto (pb) | Referência             |
|--------------------------|---------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>Enterococcus</i> spp. | Ent1    | 5'-TACTGACAAACCATTCATGATG-3'   | 112                     | (Ke et al., 1999)      |
|                          | Ent2    | 5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3'    |                         |                        |
| <i>E. faecalis</i>       | FL1     | 5'-ACTTATGTGACTAACTTAACC - 3'  | 360                     | (Jackson et al., 2004) |
|                          | FL2     | 5'-TAATGGTGAATCTTGGTTTGG - 3'  |                         |                        |
| <i>E. faecium</i>        | FM1     | 5'- GAAAAACAATAGAAGAATTAT - 3' | 215                     | (Jackson et al., 2004) |
|                          | FM2     | 5'-TGCTTTTTTGAATCTTCTTTA - 3'  |                         |                        |
| <i>E. durans</i>         | DU1     | 5'- GCAAGGCTTCTTAGAGA - 3'     | 295                     | (Jackson et al., 2004) |
|                          | DU2     | 5'- CATCGTGTAAGCTAACTTC - 3'   |                         |                        |

As estirpes de referência utilizadas foram *Enterococcus faecalis* MMH594 (gentilmente cedida por Pascale Serron (Unité des Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes, INRA, Jouy-en-Josas, França), *E. faecium* DSMZ 20477 (obtida de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha) e *E. durans* QN10 (Coleção de *Enterococcus* spp., Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa).

A amplificação foi realizada num termociclador Doppio (VWE, EUA). As condições do programa foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min; seguindo-se 35 ciclos a 95°C durante 1 min; *annealing* a 60°C durante 1 min; extensão a 72°C durante 1 min e alongamento final a 72°C durante 10 min.

Posteriormente, preparou-se o gel de agarose a 1,5% com tampão TBE 0,5X (40 mM de Tris-Cl, 45 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA). Para a eletroforese misturou-se 8 µL de produto de *PCR* com 2 µL de flurocromo Gelstar10X (Lonza, EUA) e 2 µL de azul de bromofenol. A eletroforese realizou-se em tampão TBE 0.5X a 100 V durante 2h 15 min e o marcador molecular utilizado foi NZYDNA Ladder VI (NZYTech, Portugal). Seguindo-se a visualização do gel no ChemiDoc XRS+ com o *software ImageLab* (BIO-RAS, EUA).

## 2.3 Avaliação da resistência a antibióticos

### 2.3.1 Antibiógramas

Para estudar a suscetibilidade a antibióticos, foram usados treze antibióticos, representando nove classes e três alvos diferentes (Tabela. 2.3) utilizando a técnica de difusão em disco (CLSI, 2020).

Na preparação da suspensão bacteriana, utilizaram-se 500 µL de solução de Ringer (Oxoid, UK) e cultura bacteriana, coletada de placas cultivadas *overnight* até a suspensão atingir uma concentração de 0,5 na escala de *McFarland*. Esta suspensão bacteriana foi espalhada à superfície do meio de cultura em placa de petri quadrada, utilizando esferas de vidro estéreis. Cada disco de antibiótico (Oxoid, UK) foi colocado sobre o meio inoculado suficientemente afastado dos restantes, para facilitar a leitura dos halos de inibição. As placas de petri foram incubadas a 37°C durante 24 h.

Após incubação, os diâmetros dos halos foram medidos e interpretados de acordo com as normas do *Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020).

Tabela 2.3: Antibióticos utilizados, respetivas classes e alvos.

| Antibiótico                    | Concentração (µg) | Classe           | Alvo                      |
|--------------------------------|-------------------|------------------|---------------------------|
| Gentamicina                    | 120               | Aminoglicosídeos | Síntese Proteica          |
| Estreptomicina                 | 300               |                  |                           |
| Eritromicina                   | 15                | Macrólidos       |                           |
| Linezolid                      | 30                | Oxazolidinonas   |                           |
| Cloranfenicol                  | 30                | Fenicóis         |                           |
| Quinupristina/ Dalfopristina   | 15                | Estreptograminas |                           |
| Tetraciclina                   | 30                | Tetraciclinas    |                           |
| Teicoplanina                   | 30                | Glicopéptidos    | Síntese da Parede Celular |
| Vancomicina                    | 30                |                  |                           |
| Amoxicilina/ Ácido clavulânico | 30                | Penicilinas      |                           |
| Ampicilina                     | 10                |                  |                           |
| Ciprofloxacina                 | 5                 | Quinolonas       | Síntese de DNA            |

### 2.3.2 Pesquisa de genes de resistência

Foram pesquisados os genes que possam estar envolvidos na resistência à eritromicina, tetraciclina e vancomicina, nos isolados que mostraram ser fenotipicamente resistentes aos mesmos. Para tal foi realizado um PCR-multiplex com os genes descritas na Tabela 2.4.

A mistura de reação para um volume total de 20 µL, foi: 10 µL taq Master Mix 2X (taq DNA Polymerase, tampão com 5,5 mM MgCl<sub>2</sub> e dNTPs 400 µM de cada) (Bioron, Germany), 0,5 µL de cada primer e 1 µL de DNA.

Tabela 2.4: Informações sobre os *primers* utilizados para pesquisa dos genes de resistência a antibióticos.

| Antibióticos | Gene          | Sequência dos primers   | Tamanho do produto (pb) | Referências                    |
|--------------|---------------|---|-------------------------|--------------------------------|
| Eritromicina | <i>erm(B)</i> | 5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3'<br>5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3' | 639                     | (Macovei and Zurek, 2006)      |
| Tetraciclina | <i>tet(M)</i> | 5'-ACAGAAAGCTTATTATATAAC-3'<br>5'-TGGCGTGTCTATGATGTTTAC-3'    | 171                     | (Aminov <i>et al.</i> , 2001)  |
| Vancomicina  | <i>van(A)</i> | 5'-TTGGGGGTTGCTCAGAGGAG-3'<br>5'-CTTCGTTTCAGTACAATGCGG-3'     | 931                     | (Yean <i>et al.</i> , 2007)    |
|              | <i>van(B)</i> | 5'-AAGCTATGCAAGAAGCCATG-3'<br>5'-CCGACAATCAAATCATCCTC-3'      | 536                     | (Elsayed <i>et al.</i> , 2001) |

Foram utilizadas as estirpes de referência *Enterococcus faecalis* AR01/DG (Manson *et al.*, 2003) controlo positivo para a *erm(B)*, *tet(M)* e *van(A)* e *Enterococcus faecalis* V583 (gentilmente cedido por Johannes Huebner (Division of Infectious Disease, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, EUA) controlo positivo para *van(B)*).

A amplificação foi realizada num termociclador Doppio (VWE, EUA). As condições do programa foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C durante 2 min; seguindo-se de 35 ciclos a 94°C durante 30 s; *annealing* a 55°C durante 1 min; extensão a 72°C durante 1 min e alongamento final a 72°C durante 5 min.

Posteriormente, preparou-se o gel de agarose a 1,5% com tampão TBE 0,5X (40 mM de Tris-Cl, 45 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA). Para a eletroforese misturou-se 8 µL de produto de PCR com 2 µL de flurocromo Gelstar10X (Lonza, EUA) e 2 µL de azul de bromofenol. A eletroforese realizou-se em tampão TBE 0.5X a 100 V durante 2h 15 min e o marcador molecular utilizado foi NZYDNA Ladder VI (NZYTech, Portugal). Seguindo-se a visualização do gel no ChemiDoc XRS+ com o *software ImageLab* (BIO-RAS, EUA)

## 2.4 Avaliação da presença de fatores de virulência

### 2.4.1 Testes fenotípicos

Para avaliar a virulência dos *Enterococcus* presentes nos queijos em estudo realizaram-se três testes diferentes. O primeiro foi o teste da hemólise que consiste em avaliar, se os *Enterococcus* spp. tem capacidade de lisar os glóbulos vermelhos. Para isso, inocularam-se os isolados em placas de Columbia agar com 5% de sangue de cavalo (Frilabo, Portugal). Essas placas foram incubadas durante 24 h a 37°C. A atividade hemolítica foi determinada de acordo com a cor observada no agar ao redor da colónia: quando apresenta cor verde corresponde a α-hemólise (hemólise parcial), branca γ-hemólise (não ocorre hemólise) e transparente β-hemólise (hemólise total).

O segundo teste foi a avaliação da produção da gelatinase, realizada em meio preparado com 5 g de peptona (Scharlau, Espanha), 3 g de extrato de levedura (Scharlau, Espanha), 30 g de gelatina (Difco), 20 g de ágar bacteriológico (Scharlau, Espanha) e 1 L de água destilada. Os isolados foram incubados durante 48 h a 37°C, após incubação foi adicionada uma solução Bicloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) cobrindo a superfície do meio, e após 5 min, foram observados os resultados. O teste é positivo se forem visíveis halos transparentes à volta das colónias (Su *et al.*, 1991).

Por último o teste para a avaliação da proteinase, realizado em meio preparado com 50 g de *skim milk* (Oxoid, Inglaterra), 20 g de agar bacteriológico (Scharlau, Espanha) e 1 L de água destilada. Os isolados foram incubados durante 48 h a 37°C. O teste é positivo se forem visíveis halos transparentes à volta das colónias (Graham *et al.*, 2017).

## 2.4.2 Testes genotípicos

A presença de genes de virulência foi avaliada através da realização de PCR-multiplex para pesquisa dos genes *agg*, *cylA*, *esp*, *gelE* e *frsB* (ver Tabela 2.5).

A mistura de reação para um volume total de 20 µL, foi: 10 µL taq Master Mix 2X (taq DNA Polymerase, tampão com 5,5 mM MgCl<sub>2</sub> e dNTPs 400 µM de cada) (Bioron, Germany), 0,5 µL de cada primer e 1 µL de DNA.

Tabela 2.5: Informações sobre os *primers* utilizados para a pesquisa dos genes de virulência.

| Factores de virulência                | Gene        | Sequência dos primers   | Tamanho do produto (pb) | Referências                     |
|---------------------------------------|-------------|---|-------------------------|---------------------------------|
| Substância de agregação               | <i>agg</i>  | 5'- AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC-3'<br>5'- AAACGGCAAGACAAGTAAATA-3'    | 1553                    | (Eaton and Gasson, 2001)        |
| Citolisina                            | <i>cylA</i> | 5'-TAGCGAGTTATATCGTTCAGTGA-3'<br>5'-CTCACCTCTTTGTATTTAAGCATG-3' | 1282                    | (T Semedo <i>et al.</i> , 2003) |
| Proteína de superfície de enterococos | <i>esp</i>  | 5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3'<br>5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'   | 933                     | (Eaton and Gasson, 2001)        |
| Gelatinase                            | <i>gelE</i> | 5'- ACCCCGTATCATTGGTTT-3'<br>5'- ACGCATTGCTTTTCCATC-3'          | 419                     | (Eaton and Gasson, 2001)        |
| Regulador da expressão do <i>gelE</i> | <i>frsB</i> | 5'- TTTACGGCCTGTGCGAGGTG - 3'<br>5'- CCTTGGATGACGAGACCGTAG - 3' | 327                     | (Fonseca, 2010)                 |

Foram utilizadas as estirpes de referência *Enterococcus durans* QN1 (Coleção de *Enterococcus* spp., Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa) controlo positivo para *agg*, *cylA*, *esp* e *gelE* e *Enterococcus faecalis* AR01/DG (Manson *et al.* 2003) controlo positivo para *frsB*.

A amplificação foi realizada num termociclador Doppio (VWE, EUA). As condições do programa foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min; seguindo-se de 35 ciclos a 94°C durante 30 s; *annealing* a 55°C durante 1 min; extensão a 72°C durante 1 min e alongamento final a 72°C durante 5 min.

Posteriormente, preparou-se o gel de agarose a 1,5% com tampão TBE 0,5X (40 mM de Tris-Cl, 45 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA). Para a eletroforese misturou-se 8 µL de produto de PCR com 2 µL de flurocromo Gelstar10X (Lonza, EUA) e 2 µL de azul de bromofenol. A eletroforese realizou-se em tampão TBE 0.5X a 100 V durante 2h 15 min e o marcador molecular utilizado foi NZYDNA

Ladder VI (NZYTech, Portugal). Seguindo-se e visualização do gel no ChemiDoc XRS+ com o *software ImageLab* (BIO-RAS, EUA).

### 3 Resultados e Discussão

Neste estudo, analisaram-se BAL isoladas de queijos de Nisa e Azeitão DOP do ano de 2019. Posteriormente, os resultados obtidos foram comparados com dados recolhidos em anos anteriores (2016-2018). Para o queijo de Nisa analisaram-se amostras provenientes de duas queijarias (N9 e N10), enquanto que para o queijo de Azeitão analisaram-se amostras de quatro queijarias (A1-A4). O isolamento e caracterização dos microrganismos recolhidos dos queijos produzidos em 2019 foram realizados no âmbito deste trabalho, enquanto os restantes (2016, 2017 e 2018) foram estudados no âmbito das dissertações de mestrado realizados por Batista, 2017; Ruivo, 2018 e Rocha, 2019.

No presente estudo aprofundou-se a análise do potencial de patogenicidade de *Enterococcus* spp., incluindo a pesquisa da presença de genes de resistência a antibióticos e fatores de virulência.

#### 3.1 Microbiologia convencional: Comparação entre queijarias e anos de produção

Num estudo anterior (Ruivo, 2018), através da análise metagenómica, teve como objetivo descobrir mais sobre a comunidade microbiana presente nos queijos e identificar os principais géneros presentes, tendo concluído que os microrganismos maioritários pertenciam ao grupo das BAL.

Assim sendo, o presente estudo focou-se nas bactérias ácido lácticas, um grupo que inclui diferentes géneros bacterianos, incluindo *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp., entre outros. Embora pertençam todas ao grupo das BAL, vamos dividi-las em três grupos diferentes e estudá-las separadamente. As BAL foram isoladas em meio MRS, que permite o crescimento preferencial de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (Drake *et al.*, 1996; Man, 1995). Para o género *Enterococcus* utilizou-se o meio Slanetz and Bartley agar, que é um meio seletivo para este género bacteriano, sendo que as colónias de enterococos apresentam uma cor vermelha (Jurkovič *et al.*, 2006). Por fim, o género *Lactococcus* foi analisado utilizando o meio seletivo M17 (Macedo *et al.*, 2004).

Como se pode observar na Figura 3.1, as queijarias de Nisa e Azeitão revelaram possuir valores de contagens semelhantes, na ordem dos  $10^7$  UFC/g e  $10^8$  UFC/g, respetivamente. Os valores das UFCs obtidos são idênticos a outros resultados publicados anteriormente sobre queijos com características semelhantes às amostras analisadas. Como é o caso dos queijos Manchego e Terrincho, que são queijos DOP produzidos com leite de ovelha de forma artesanal, que apresentam contagens com valores na ordem das  $10^7$  UFC/g e  $10^9$  UFC/g (Cabezas *et al.*, 2007; Pintado *et al.*, 2008).

Nas queijarias de Azeitão é visível que o ano de 2016 foi onde se obteve o maior número de contagens de unidades formadoras de colónias (UFCs), enquanto que nos restantes anos as contagens foram mais baixas e semelhantes entre si. A queijaria de Nisa (N10) obteve contagens superiores no ano 2016 contrariamente a este, a outra queijaria de Nisa (N9) apresentou contagens menores no ano 2016 e contagens mais elevadas em 2017.



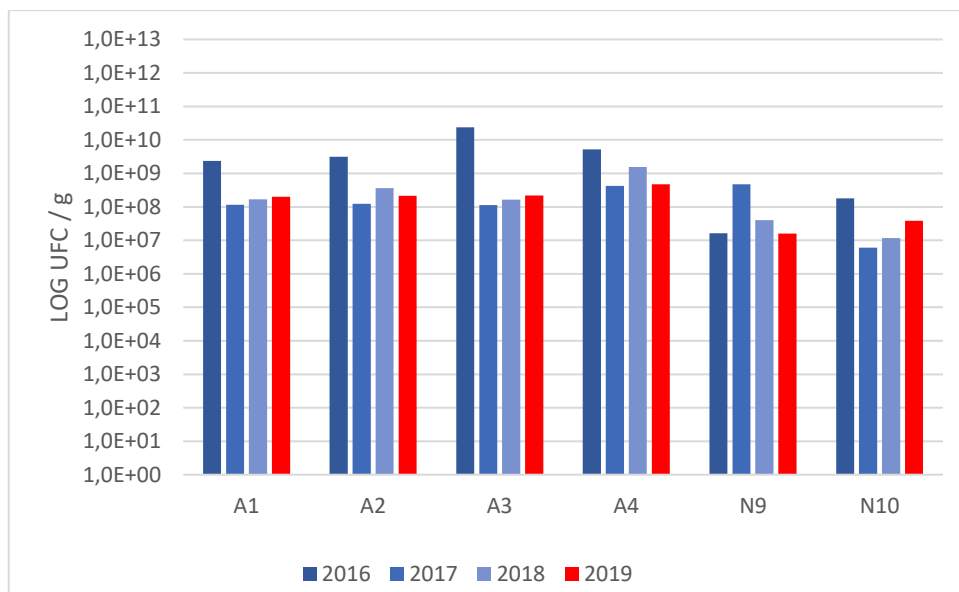


Figura 3.1: Contagens de unidades formadoras de colónias de BAL isoladas em meio MRS (2016-19). As queijarias de Azeitão estão representadas com a letra A e as de Nisa com a letra N.

Posteriormente, considerou-se o género *Lactococcus* (Figura 3.2). Os *Lactococcus* representam a grande maioria da microbiota presente em queijos tradicionais (Gonçalves *et al.* 2018), pois têm uma grande importância no processo de fabrico do mesmo, contribuindo para a acidificação do meio, facilitando a coagulação do leite e a proteólise da caseína, que são processos essenciais no fabrico do queijo. O metabolismo dos aminoácidos e dos ácidos gordos, realizado por essa género, contribui ainda para o sabor e características organoléticas do produto final (Riquelme *et al.*, 2015).

As amostras provenientes de queijo Nisa apresentaram contagens elevadas no ano 2017, na ordem dos 10<sup>12</sup> UFC/g, o que não aconteceu nos anos 2016, 2018 e 2019, com contagens na ordem dos 10<sup>7</sup> UFC/g. Uma das causas desta diferença pode ser que, quando se realizou a recolha da amostra no ano de 2017 se tenha recolhido uma maior percentagem de microrganismos do interior do queijo em relação à casca (parte exterior). Sabe-se através de outros estudos que o interior do queijo é mais rico em *Lactococcus* pois são bactérias anaeróbias facultativas, não precisando de oxigénio para crescerem (Flórez and Mayo 2006). As amostras do ano 2016, 2018 e 2019 estão de acordo com os resultados relatados no estudo feito ao queijo de Terrincho, onde o valor foi de 10<sup>8</sup> UFC/g (Pintado *et al.* 2008).

As amostras das queijarias de Azeitão apresentaram contagens semelhantes ao longo dos anos de produção em análise, essas contagens estão de acordo com o valor apresentado no estudo acerca de queijo de Manchego (Pintado *et al.* 2008), embora seja um queijo espanhol é igualmente produzido com leite de ovelha e apresenta uma pasta amanteigada como os queijos de Azeitão. No entanto, há uma ligeira diferença nas queijarias A1, A2 e A3, sendo visível um maior número de contagens no ano 2016 e 2017, em relação aos anos 2018 e 2019, essas diferenças podem resultar do facto de o leite utilizado ser leite cru e haver uma grande variabilidade no número de bactérias presentes, uma vez que não existe tratamento térmico, nem adição de culturas *starter*.

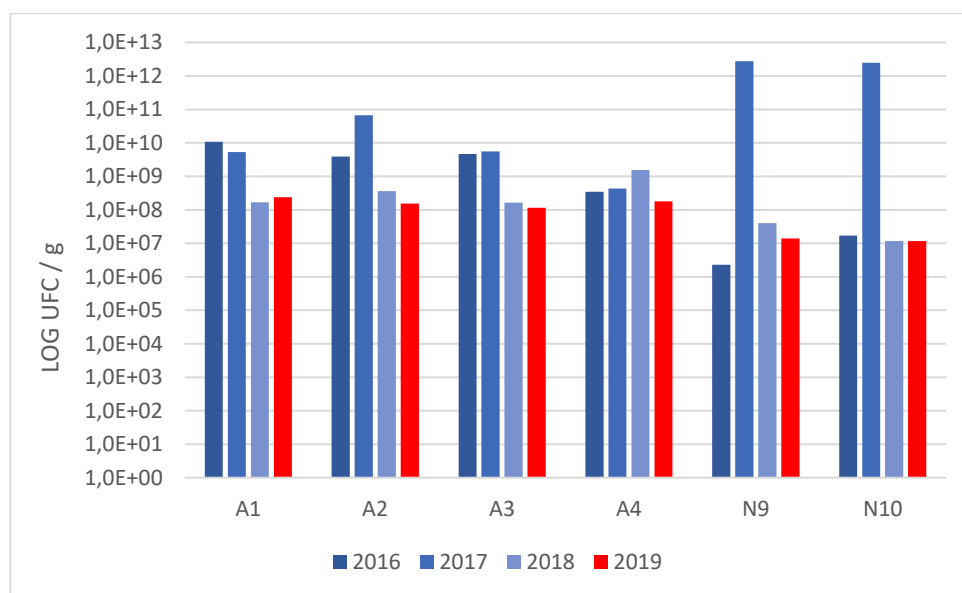


Figura 3.2: Contagens de unidades formadoras de colónias de *Lactococcus* em meio M17 (2016-19). As queijarias de Azeitão estão representadas com a letra A e as de Nisa com a letra N.

O isolamento de microrganismos do género *Enterococcus* mostrou que as contagens de UFCs (Figura 3.3) são menores em relação às restantes bactérias estudadas, valores entre  $10^4$  e  $10^7$  UFC/g, resultados concordante com outros estudos (Cabezas *et al.*, 2007; Jurkovič *et al.*, 2006; Pintado *et al.*, 2008) em que foram analisados os queijos Terrincho, Bryndza e Manchego. Os anos 2016 e 2019 foram os que apresentaram um número de UFCs superior para a maioria das queijarias em relação aos restantes anos. Em queijos tradicionais como é o caso do queijo de Nisa e Azeitão usa-se leite cru, sem adição de culturas *starter* o que resulta em valores mais discrepantes nas contagens de UFCs do que em queijos não tradicionais.

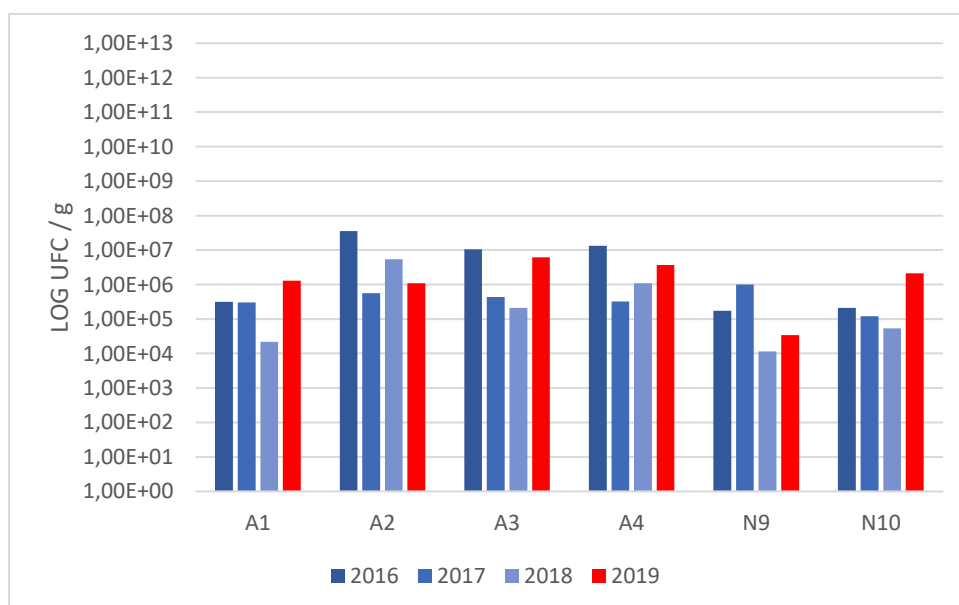


Figura 3.3: Contagens de unidades formadoras de colónias de *Enterococcus* em meio SBA (2016-19). As queijarias de Azeitão estão representadas com a letra A e as de Nisa com a letra N.

Quando comparadas as contagens de todas as espécies de bactérias estudadas nas queijarias de Azeitão e Nisa é visível uma redução do número de microrganismos nas queijarias de Nisa. Podendo

estes dados ser explicados pelo facto de o queijo de Nisa ser um queijo semi-duro e menos húmido, apresentando também um teor em sal mais elevado, o que não será tão favorável ao crescimento de BAL, principalmente do género *Lactococcus* (Freitas and Malcata, 2000; Pintado *et al.*, 2008).

Devido à situação atual de pandemia, com os seus graves e forçados confinamentos, durante vários meses as idas ao laboratório não foram permitidas ou tinham limitações, tendo afetado o desenvolvimento da parte prática inicialmente prevista. Assim, foi necessário ajustar o plano inicial, direcionando o estudo para apenas um dos grupos bacterianos anteriormente referidos. Assim sendo, dos três grupos iniciais, os resultados a seguir descritos referem-se apenas ao género *Enterococcus*, para o qual foi realizada uma análise mais detalhada.

## 3.2 Métodos moleculares

### 3.2.1 Avaliação da diversidade microbiana

A diversidade de *Enterococcus* presente nos queijos de Nisa e Azeitão produzidos em 2019 foi estudada com recurso à técnica RAPD-PCR e posteriormente à eletroforese que permitiu a observação dos perfis de bandas. Após obtenção dos perfis foi utilizado o software BioNumerics (versão 6.6.5 da *Applied Maths*, Bélgica) para comparar as semelhanças/diferenças entre queijarias, através da construção de dendrogramas.

O primeiro dendrograma criado foi obtido por comparação de 10% das amostras com as suas respectivas réplicas, com o objetivo de calcular o índice de reprodutibilidade da técnica. O índice de reprodutibilidade obtido foi de 78,08%, nos restantes dendrogramas esse valor foi tido em consideração, pois todos os isolados com níveis de semelhança iguais ou superiores a este foram considerados iguais (ou muito semelhantes). No apêndice A encontram-se os dendrogramas de todas as queijarias em estudo, com o índice de reprodutibilidade assinalado e os *clusters* formados. No caso das queijarias de Nisa fez-se um segundo RAPD-PCR com um primer diferente (M13) para confirmar os elevados níveis de semelhança genómica observados entre os isolados. Este segundo RAPD-PCR mostrou que na queijaria N9 existiam dois *clusters*, em vez de um só *cluster* e na queijaria N10 possuía três *clusters*, cinco a menos que o dendrograma anterior (dados não apresentados).

A comparação dos perfis obtidos para os isolados de cada queijaria teve dois objetivos: (1) avaliar a diversidade microbiana da queijaria e (2) permitir a seleção de representantes (*enterococos* genomicamente distintos) para avaliação do potencial de patogenicidade (pesquisa da resistência a antibióticos e fatores de virulência).

Assim, de cada amostra, foi selecionado um isolado por *cluster* como representante desse perfil, como forma ilustrativa da escolha dos representantes, o dendrograma da Figura 3.4 apresenta setas nos isolados escolhidos.

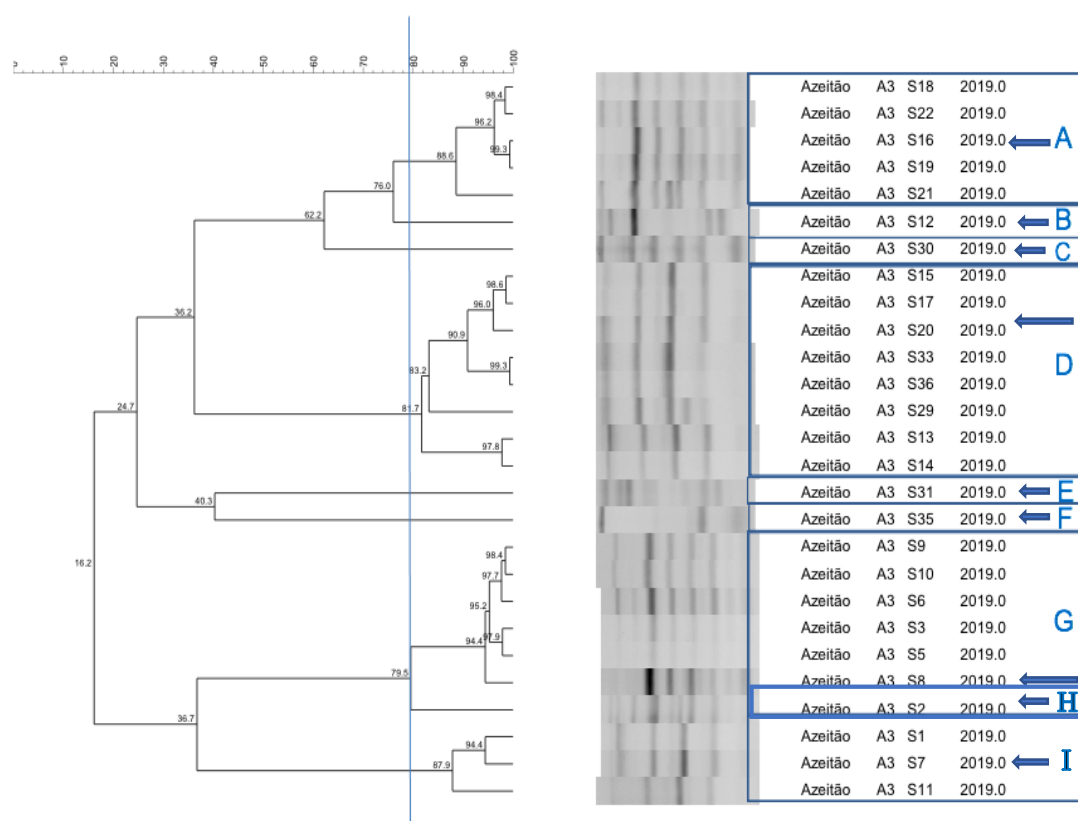


Figura 3.4: Dendrograma de *Enterococcus* isolados da queijaria A3. O índice de reprodutibilidade corresponde a 78,08% (linha azul) e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados. Na queijaria A3 foram identificados nove *clusters*, quatro deles com apenas um membro (*single member clusters*).

Das seis queijarias, foram selecionados um total de 42 enterococos. A identificação e a avaliação da patogenicidade foram feitas apenas aos representantes.

Por fim, calcularam-se para cada queijaria os índices de Simpson ( $D'=1-D$ ) e Shanon-Weaver ( $J'$ ). Abordagem semelhante foi realizada para os enterococos isolados de queijos produzidos em 2016, 2017 e 2018 por estudantes de mestrado, que trabalharam para o mesmo projeto de investigação (Batista, 2017; Ruivo, 2018 e Rocha, 2019). No presente trabalho vão ser comparados esses resultados anteriores com os obtidos para os isolados de 2019.

### 3.2.1.1 Comparação entre os diferentes anos de produção

Na Tabela 3.1 estão representados os índices de diversidade ao longo dos anos e para cada queijaria.

Tabela 3.1: Valores dos índices de diversidade calculados para as diferentes queijarias em diferentes anos de produção (2016-19).

| Ano de produção | Queijarias | Índice de Simpson (D') | Índice de Shanon-Weaver (J') |
|-----------------|------------|------------------------|------------------------------|
| 2016            | A1         | 0,395                  | 0,811                        |
|                 | A2         | 0,54                   | 0,999                        |
|                 | A3         | 0,44                   | 0,785                        |
|                 | A4         | 0,074                  | 0,229                        |
|                 | N9         | 0                      | 0                            |
|                 | N10        | 0                      | 0                            |
| 2017            | A1         | 0,757                  | 0,805                        |
|                 | A2         | 0,344                  | 0,738                        |
|                 | A3         | 0,617                  | 0,736                        |
|                 | A4         | 0,78                   | 0,854                        |
|                 | N9         | 0,727                  | 0,914                        |
|                 | N10        | 0,46                   | 0,714                        |
| 2018            | A1         | 0,487                  | 0,556                        |
|                 | A2         | 0,917                  | 0,982                        |
|                 | A3         | 0,953                  | 0,961                        |
|                 | A4         | 0,547                  | 0,819                        |
|                 | N9         | 0,697                  | 0,858                        |
|                 | N10        | 0,956                  | 0,964                        |
| 2019            | A1         | 0,77                   | 0,80                         |
|                 | A2         | 0,67                   | 0,68                         |
|                 | A3         | 0,85                   | 0,84                         |
|                 | A4         | 0,71                   | 0,71                         |
|                 | N9         | 0,41                   | 0,85                         |
|                 | N10        | 0,77                   | 0,78                         |

No ano de 2019 a queijaria com maior diversidade foi A3 ( $D'=0,85$ ;  $J'=0,84$ ) com 8 *clusters* (Fig. 3.4) com quatro grupos de um único isolado (*single-member clusters*), no ano de 2016 a queijaria que apresentou maior diversidade foi A2 ( $D'=0,54$ ;  $J'=0,999$ ), no ano de 2017 a queijaria A4 ( $D'=0,78$ ;  $J'=0,854$ ) e no ano 2018 a queijaria com maior diversidade foi N10 ( $D'=0,956$ ;  $J'=0,964$ ). Tendo em conta os quatro anos em análise, conclui-se que o ano 2018 foi onde a diversidade foi maior com 95% de probabilidade de dois isolados escolhidos aleatoriamente pertencerem a grupos diferentes, seguindo-se o ano de 2019 com 85%.

A queijaria com menor diversidade encontrada no ano de 2019 foi a N9 ( $D'=0,41$ ;  $J'=0,85$ ) com 2 *clusters* com apenas um membro (Figura 3.5).

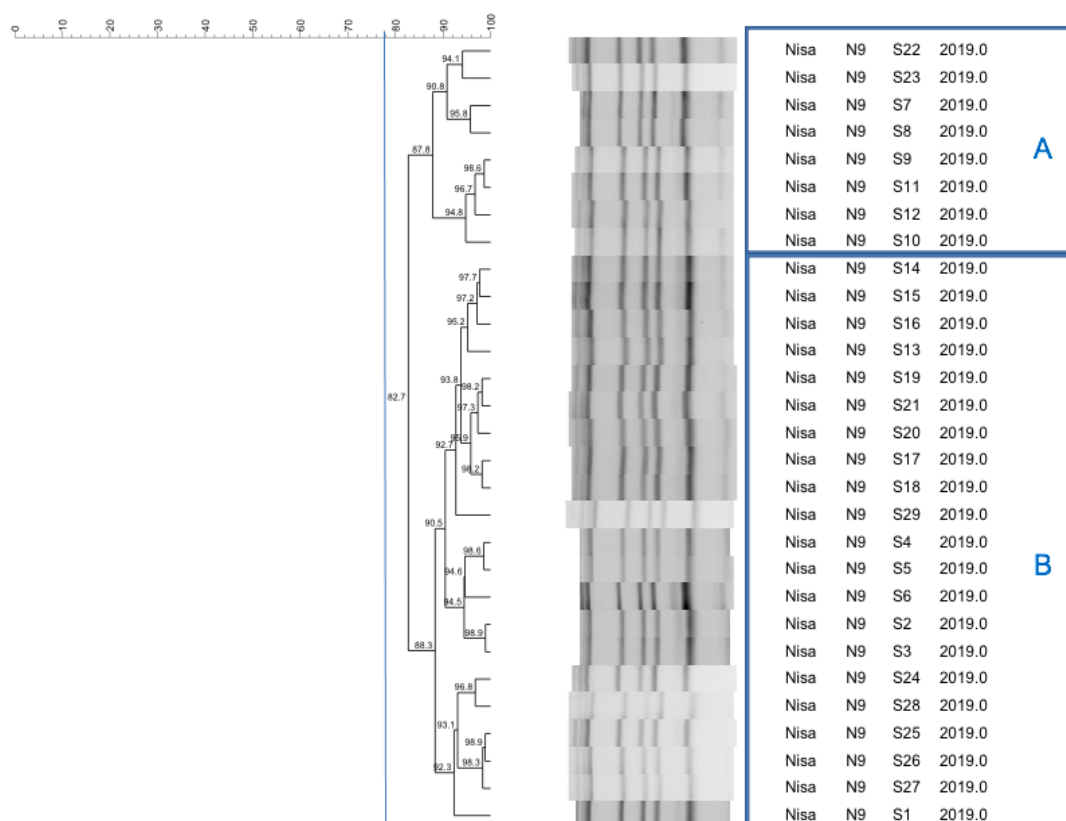


Figura 3.5: Dendrograma de *Enterococcus* isolados da queijaria N9. O índice de reprodutibilidade corresponde a 78,08% (linha azul) e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados. Apesar do dendrograma demonstrar apenas um *cluster* com todos os isolados, análise posteriores mostraram que na verdade existem dois *clusters*.

No ano de 2016 e 2018 foi também a queijaria N9 que apresentou menor diversidade e no ano 2017 foi a queijaria N10 ( $D'=0.46$ ;  $J'=0.714$ ). Ao longo destes 4 anos conseguimos ver uma tendência para as queijarias de Nisa apresentarem uma menor diversidade de *Enterococcus*, em relação às de Azeitão, sendo que a queijaria N9 foi a que apresentou menor diversidade em três dos quatro anos estudados e a N10 foi a que apresentou menor diversidade no ano 2017. Os queijos de Nisa são semi-duros e apresentam um reduzido teor de humidade, condições não tão favoráveis ao crescimento de microrganismos desse género como os queijos de azeitão, que são queijos com pasta semi-mole e amanteigada (Pintado *et al.*, 2008).

### 3.2.1.2 Comparação entre queijarias

Para se obter uma análise global de todas as queijarias, construiu-se um dendrograma com os perfis *RAPD* de todos os isolados do ano 2019. Com esse dendrograma pretendeu-se perceber se existem semelhanças entre isolados das diferentes queijarias ou se os *clusters* formados dependem da sua origem. Para a construção do dendrograma foi utilizada a mesma linha de corte anteriormente referida (78,08%). O dendrograma obtido (Apêndice B) mostrou a existência de 40 *clusters* e os resultados dos índices de diversidade foram ( $D'=0.906$ ;  $j'=0.795$ ). Assim sendo, podemos afirmar que a probabilidade de escolher dois isolados ao acaso e eles serem diferente é de 91%, quantos mais *clusters* existirem maior será o índice de Simpson ( $D'$ ). O índice de Shannon-Weaver ( $j'$ ) permite-nos avaliar a riqueza dos grupos e a uniformidade da abundância, dentro dos diferentes grupos formados. Representa a proporção

entre o observado e o máximo de diversidade possível. Significando que há aproximadamente 80% de probabilidade de um isolado pertencer a um dado grupo.

O dendrograma mostra que, dos 40 clusters formados, 35 são formados por isolados pertencentes à mesma queijaria e apenas cinco tem isolados provenientes de queijarias diferentes. Significando que há isolados que são característicos de uma dada queijaria, no entanto também há uma minoria de isolados que são encontrados em diferenças queijarias. Um estudo anterior que caracterizou fenotipicamente e genotipicamente as BAL *non-starter* em queijo Cheddar maturado, também concluiu que os isolados do queijo provenientes da mesma queijaria tem tendência a agrupar (Fitzsimons *et al.*, 1999). Paralelamente, há uma tendência para os isolados serem diferentes de região para região, mostrando que cada região (Nisa ou Azeitão) tem a sua própria microbiota, podendo ser esses os microrganismos responsáveis pelas características (organolépticas, sabor e textura) únicas de cada queijo. As diferenças observadas nos resultados, podem ser justificadas pelo facto do leite ter origem, de áreas geográficas diferentes, ser proveniente da raça autóctone que se adapta às condições dessa mesma região bem como à alimentação, que neste tipo de explorações é muito dependente de algumas espécies espontâneas dos seus solos.

Quando se procede à análise da diversidade das queijarias separadamente, observa-se uma diferença notória de diversidade entre as queijarias de Nisa e Azeitão, pois para um número idêntico de isolados por queijaria temos um número de grupos formados muito diferente. Um exemplo muito claro é entre a queijaria A3 de Azeitão (Figura 3.4) a queijaria N9 de Nisa (Figura. 3.5). Na primeira temos o dendrograma dividido em oito *clusters* com dimensões variadas existindo diversos *clusters* com um único isolado, mas na segunda observam-se apenas dois *clusters*.

Uma justificação para estas discrepâncias, i.e para as queijarias de Nisa apresentarem uma diversidade mais baixa, poderá ser o facto de o leite utilizado em cada queijo ser proveniente de ovelhas de raças distintas e/ou devido a características do próprio queijo que não favorecem o crescimento de bactérias do grupo das BAL (Pintado *et al.*, 2008).

Quando se analisa em simultâneo a diversidade obtida para o género *Enterococcus* e o número de UFCs obtidas, percebe-se que apesar de ser o grupo bacteriano com contagens mais reduzidas ( $2,40 \times 10^6$ ), a diversidade observada foi elevada ( $D' = 0,906$ ;  $j' = 0,795$ ). Durante muito tempo a presença de enterococos foi considerada problemática, pois era sinal de contaminação fecal, mas atualmente os *Enterococcus* são considerados como fazendo parte da microbiota dos produtos lácteos tradicionais. Diversos estudos com queijos produzidos com leite cru (Macedo *et al.*, 2004; Nieto-Arribas *et al.*, 2011) (Giraffa, 2003) demonstraram o papel importante que as bactérias deste género tem na fermentação e maturação do queijo (Demarigny *et al.*, 1997). Por isso, o que podemos ver a partir dos resultados obtidos no presente estudo é que ainda mais importante do que ter um elevado número de contagem, o que realmente parece fazer diferença é a elevada diversidade de *Enterococcus* presentes nos queijos. Seria interessante em trabalhos futuros analisar o potencial tecnológico dos isolados, para percebermos se esta maior diversidade pode influenciar de forma positiva ou negativa as características organolépticas dos diferentes queijos.

### 3.2.2 Identificação do género e da espécie

Realizou-se um PCR-multiplex na tentativa de se conseguir identificar os *Enterococcus* spp. ao nível de espécie, bem como obter a confirmação molecular da identificação ao nível de género.

Na realização do PCR-multiplex foram utilizados três conjuntos de *primers* para a identificação das espécies que são as mais comuns em queijos feitos com leite cru, tais como *E. faecalis*, *E. faecium* (Wierzchowska *et al.*, 2020; Giraffa, 2003; Pimentel *et al.*, 2007) e *E. durans*, embora este último não seja tão predominante.

Dos 42 isolados de 2019 confirmou-se que todos são *Enterococcus* spp., 16 (38%) foram identificados como *E. faecalis*, cinco (12%) como pertencentes à espécie *E. faecium*, cinco (12%) como pertencentes à espécie *E. durans* e 16 (38%) como *Enterococcus* sp. por não pertencerem a nenhuma das espécies pesquisadas. Para a identificação desses isolados seria importante a realização de um PCR com outros *primers* específicos para *Enterococcus*, uma vez que os 16 isolados não identificados ao nível da espécie podem pertencer a outras não tão frequentes em queijos como *E. hirae*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. italicus* e *E. gallinarum*. (Wierzchowska *et al.*, 2020; İspirli *et al.*, 2017; Nieto-Arribas *et al.*, 2011).

Como se pode ver, a espécie *E. faecalis* apresenta uma clara dominância em relação às restantes duas espécies, o que também aconteceu em estudos com outros queijos com características equivalentes como ser utilizado leite de ovelha cru no seu fabrico (Nieto-Arribas *et al.*, 2011; Ortigosa *et al.*, 2008), podendo ser a presença dessas bactérias que influencia as características organolépticas únicas desses queijos, uma vez que os *Enterococcus* são responsáveis pelo processo de fermentação devido à sua atividade proteolítica e à capacidade de hidrolisar a gordura do leite e contribuem também para o processo de maturação (Demarigny *et al.*, 1997; Quigley *et al.*, 2013).

Quando os resultados foram comparados com os obtidos numa dissertação anterior (Rocha, 2019) percebemos que a espécie predominante foi *E. faecium* contrariamente a este estudo em que a espécie predominante foi *E. faecalis* no entanto, como dito anteriormente, ambas são normalmente as que estão mais presentes na microbiota do queijo, essa variação pode ser explicada pelo facto do leite utilizado, no fabrico de queijo, ser cru sem a adição de culturas *starters* não havendo controlo das bactérias que estão presentes, existindo assim uma grande variedade. No entanto, também não foi possível identificar alguns dos isolados, podendo estes pertencer igualmente às espécies mencionadas anteriormente.

## 3.3 Avaliação do potencial patogénico

### 3.3.1 Resistência aos antibióticos

Nos dias de hoje um problema muito debatido é o continuo aumento das resistências aos antibióticos. O uso massivo de antibióticos, com fim terapêutico e como promotores de crescimento de alguns animais poderá estar por trás dessa problemática. Muitos estudos têm sido desenvolvidos no âmbito da pesquisa de resistências em *Enterococcus* de origem alimentar ou clínica e alertam para o controlo da incidência e emergência de estirpes resistentes nos alimentos, de modo a garantir o tratamento das infeções com eficácia. Apesar de os alimentos não representarem um risco direto, podem servir como reservatório de *Enterococcus* resistentes com características que permitem a sua persistência e disseminação (Barbosa *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2000; Conwell *et al.*, 2017; Demarigny *et al.*, 1997; Pesavento *et al.*, 2014).

No presente trabalho foi testada resistência a 13 antibióticos, pertencentes a nove classes diferentes (aminoglicosídeos, macrólidos, oxazolidinonas, fenicóis, estreptograminas, tetraciclinas, glicopéptidos, penicilinas e quinolonas) e três alvos (síntese proteica, síntese da parede celular e síntese



de DNA). Para se determinar se um isolado era resistente ou suscetível a um determinado antibiótico teve-se em consideração duas organizações diferentes: *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Embora fosse mais correto utilizar o EUCAST, por ser quem rege as normas europeias, isso não foi possível para todos os antibióticos, uma vez que esta organização foi formada em 1997, há relativamente pouco tempo quando comparado com outras organizações, e não possui valores de referência para todos os antibióticos utilizados neste estudo (p. ex.: Linezolide, Gentamicina e Ciprofloxacina), por essa razão optou-se por utilizar também os valores recomendados pelo CLSI.

No entanto, estas duas organizações apresentam discrepâncias nos valores de referência e por vezes um isolado é considerado resistente segundo uma classificação e suscetível utilizando a outra. Com por exemplo o valor de referência, segundo EUCAST, para a resistência à teicoplanina é de halo de inibição inferior a 16 mm, enquanto que o valor para o mesmo antibiótico segundo CLSI é um halo inferior a 11 mm.

Analisando os resultados obtidos para os isolados em estudo segundo EUCAST (2019), na Figura 3.6 pode observar-se que os *Enterococcus* apresentam resistência à quinupristina-dalfopristina.

O elevado número de isolados resistentes a esse antibiótico pode ser explicado pelo facto de os *Enterococcus* serem considerados intrinsecamente resistentes a este agente (Hollenbeck and Rice 2012). Resultado equivalente foi registado nos restantes anos, com a exceção do ano 2018 em que os isolados revelaram possuir maior resistência à teicoplanina (Rocha, 2019), no entanto essa resistência nos *Enterococcus* é considerada adquirida. A resistência intrínseca por parte dos *Enterococcus* às estreptograminas (quinupristina-dalfopristina) e lincosamidas (não utilizado neste trabalho) é conferida pela expressão do gene *Isa* (Hollenbeck and Rice, 2012).

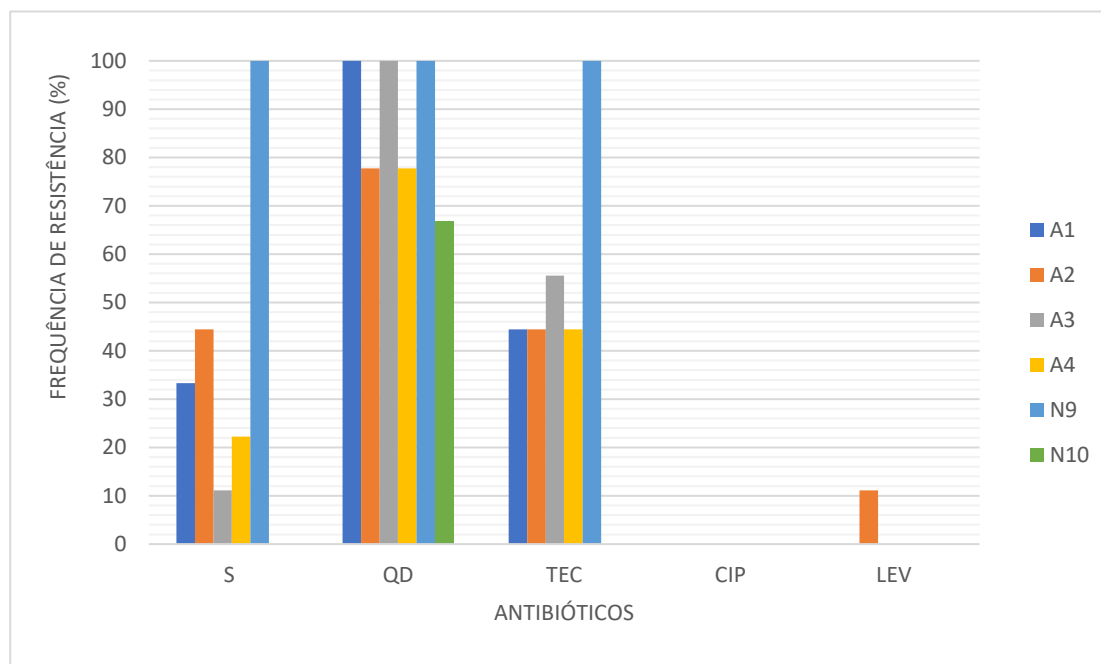


Figura 3.6: Frequência de isolados resistentes por queijarias e antibióticos utilizados, segundo os valores de EUCAST. S: Estreptomicina 300 µg; QD: Quinupristina- Dalfopristina 15 µg; TEC: Teicoplanina 30 µg; CIP: Ciprofloxacina 5 µg; LEV: Levofloxacina 5 µg.

Em segundo lugar, houve um maior número de *Enterococcus* resistentes à teicoplanina (19 isolados), mas apenas considerando os limites do EUCAST, segundo as normas do CLSI não há resistentes a este agente. Resistência à vancomicina, que tal com a teicoplanina pertence à classe dos

glicopéptidos, foi encontrada apenas num isolado segundo o CLSI. Estas resistências também foram verificadas em outros estudos com *Enterococcus* de origem alimentar ( Wierzychowska *et al.*, 2020; Delpech *et al.*, 2012; Elal Mus *et al.*, 2017; Russo *et al.*, 2018b). A presença desta resistência é bastante preocupante, uma vez que são antibióticos de última linha, utilizados em pacientes em que os  $\beta$ -lactâmicos não sejam recomendados, em caso de alergias ou infecções por bactérias resistentes a estes (Giraffa, 2002). Outra preocupação é a capacidade que estas resistências tem de se espalhar via THG ( Transferência Horizontal de Genes) uma vez que pode ser adquirida/transmitida, como por exemplo pelo transposon Tn1546 (Arthur *et al.*, 1993).

Para a estreptomicina os valores de referências descritos são iguais para EUCAST e CLSI, obtendo-se assim igual número de resistentes com as duas análises. A estreptomicina pertence à classe dos aminoglicosídeos. Os *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a níveis reduzidos de aminoglicosídeos, devido à capacidade limitada desses agentes penetrarem na parede celular, sendo raro a ocorrência de resistência intrínseca a níveis elevados (Barbosa *et al.*, 2009; Gaglio *et al.*, 2016). Considerando que a concentração de estreptomicina utilizada neste trabalho foi elevada (300  $\mu$ g) consideram-se os resultados obtidos como resistência adquirida. No artigo (Gaglio *et al.*, 2016) também encontraram resistência à estreptomicina, no entanto identificaram que dois isolados apresentavam resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e um deles tinha sido isolado de queijo, podendo servir com veículo para a transmissão dessa resistência à microbiota presente no trato intestinal humano, levando outras estirpes a adquirir essa resistência.

Para os dois antibióticos testados pertencentes à classe das quinolonas (levofloxacina e ciprofloxacina) obteve-se apenas um isolado resistente e total suscetibilidade respectivamente, para as duas organizações CLSI e EUCAST. Resultados muito equivalentes foram obtidos no estudo dos queijos de Azeitão e Nisa dos anos 2016, 2017 e 2018 (Rocha, 2019) em que os isolados não mostraram ser resistentes a esses antibióticos. Vários estudos anteriores comprovam os nossos resultados, com a obtenção de resultados idênticos de baixa reduzida de isolados resistentes (Barbosa *et al.*, 2009; Elal Mus *et al.*, 2017), apesar de serem antibióticos muito utilizadas no tratamento clínico de infecções provocadas por *Enterococcus*. Podendo estes adquirir a capacidade de sobreviver e crescer na presença desses antibióticos, atuando como reservatório dos genes e potenciando a transferência desses genes para estirpes presentes nos humanos, através de transferência horizontal (Jahan *et al.*, 2015).

Falando agora apenas dos antibióticos avaliados tendo em conta os valores de referência CLSI (ver resumo dos resultados na Figura 3.7). Em relação às resistências estudadas em anos anteriores, foram observadas novas resistências aos seguintes antibióticos: levofloxacina e amoxicilina/ácido clavulânico e um número crescente de isolados resistentes à quinopristina-dalfapristina, eritromicina, ampicilina, eritromicina e estreptomicina.

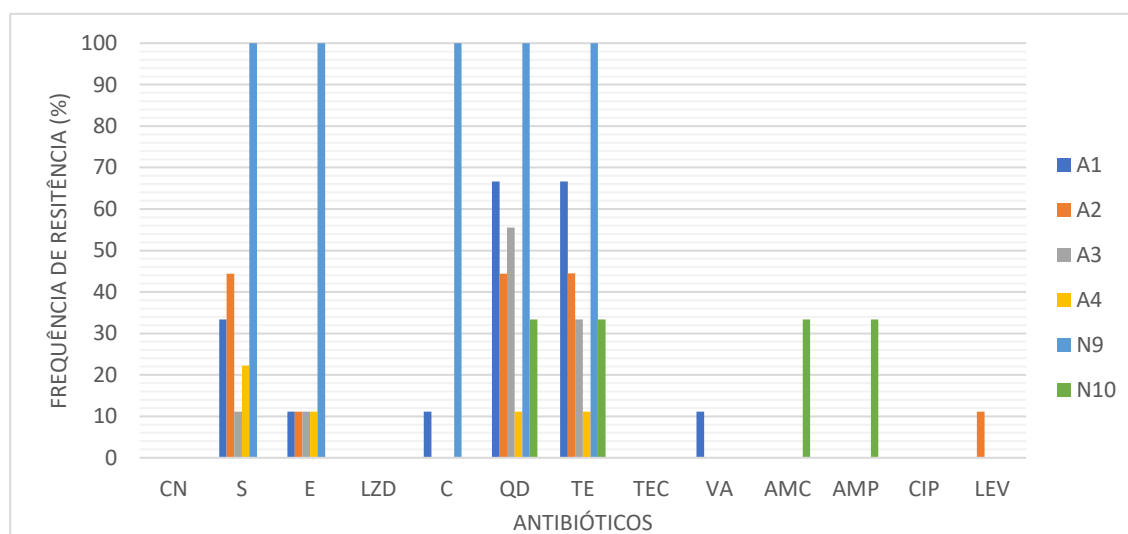


Figura 3.7: Frequência de isolados resistentes por queijarias e antibióticos utilizados, segundo os valores de CLSI. CN: Gentamicina 120 µg S: Estreptomicina 300 µg; E: Eritromicina 15 µg; LZD: Linezolid 30 µg; C: Cloranfenicol 30 µg; QD: Quinupristina- Dalfopristina 15 µg; TE: Tetraciclina 30 µg; TEC: Teicoplanina 30 µg; VA: Vancomicina 30 µg; AMC: Amoxicilina-Ácido Clavulânico 30 µg; AMP: Ampicilina 10 µg; CIP: Ciprofloxacina 5 µg; LEV: Levofloxacina 5 µg.

O mesmo número de isolados que apresenta resistência à tetraciclina também apresenta à quinupristina-dalfopristina. Hoje em dia a resistência à tetraciclina por parte dos *Enterococcus* é bastante comum, daí que o seu uso no tratamento de infeções provocadas pelos mesmos seja cada vez menor, pela falta de eficácia (Hollenbeck and Rice, 2012). Vários estudos comprovam as altas percentagens de resistências em *Enterococcus* provenientes de alimentos (Kürekci *et al.*, 2016; Ogier and Serror, 2008). A elevada taxa de resistência provém do uso desse antibiótico na medicina veterinária como promotor de crescimento do gado e no tratamento de infeções (Hammad, Hassan, and Shimamoto, 2015).

Um número reduzido de isolados apresentaram resistência à eritromicina, com exceção da queijaria N9, em que todos os isolados são resistentes a este agente. Essa resistência é descrita em outros artigos (Delpech *et al.*, 2012; Rózańska *et al.*, 2019). Tal com a resistência à tetraciclina, a resistência à eritromicina tem sido associada à utilização desses antibióticos na medicina veterinária. O surgimento de casa vez mais *Enterococcus*, isolados de alimentos, resistentes à eritromicina (pertence à classe dos macrólitos) é uma grande preocupação, pois os estes agentes são normalmente utilizados em pacientes que apresentam alergia à penicilina (Barbosa *et al.*, 2009).

Para o cloranfenicol foram encontrados apenas três enterococos resistentes, pertencentes a duas queijarias diferentes. Estudos anteriores mostraram igualmente baixos níveis de resistência ao cloranfenicol (Serio *et al.*, 2007; Sukmawinata *et al.*, 2018). Para o tratamento humano, o uso de cloranfenicol é reduzido, devido aos seus efeitos secundário e o uso na pecuária é proibido na Europa desde 1994 (Barbosa *et al.*, 2009).

Em relação à amoxicilina e ampicilina, ambos pertencentes à classe dos  $\beta$ -lactâmicos, apenas foi detetado um isolado resistente. Mostrando assim que os *Enterococcus*, mesmo sendo intrinsecamente resistentes a esta classe de antibióticos, possuem uma baixa resistência. Diversos artigos em que foi estudada a resistência de *Enterococcus* provenientes de amostras alimentares, incluído queijos, mostraram resultados idênticos (Hammad *et al.*, 2015; Serio *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2015).

Não foram encontradas quaisquer resistências ao linezolid, gentamicina, ou à ciprofloxacina.

O facto de não ter sido encontrada resistência ao linezolid é um resultado muito positivo, uma vez que é um antibiótico recente, a sua utilização é recomendada em infeções causadas por enterococos resistentes à vancomicina (Gonzales *et al.*, 2001).

A gentamicina pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, quando presentes em concentrações reduzidas os *Enterococcus* apresentam uma resistência intrínseca, o facto dos isolados estudados neste trabalho não mostrarem ser resistentes a esse fármaco demonstra que não adquiriram essa resistência uma vez que a concentração utilizada (120 µg) foi elevada. Mostrando ser um resultado bastante satisfatório, pois este fármaco é uma escolha muito comum no tratamento de infeções por enterococos (Gaglio *et al.*, 2016).

Em relação à ciprofloxacina, a resistência em muitas espécies ocorre por meio de mutações nas “regiões determinantes da resistência às quinolonas” (Kim and Woo, 2016). O facto de não terem sido encontrados resistências mostra resultados promissores, pois tal como os antibióticos anteriores também este é muito utilizado no tratamento de infeções provocadas pelos enterococos podendo estes adquirir essa resistência, atuar como reservatório dos genes e transferi-los para outras estirpes (Jahan *et al.*, 2015).

Segundo Magiorakos *et al.*, 2012, o conceito de multirresistência refere que para um dado isolado ser considerado multirresistente deve ser resistente a pelo menos um antibiótico de três classes com alvos diferentes. Tendo em consideração esse conceito, apenas um isolado dos 42 enterococos em análise pode ser considerado multirresistente. A presença de apenas um isolado multirresistente pode ser considerada uma situação não muito grave, uma vez que esse isolado não apresenta resistência à gentamicina e vancomicina, que são antibióticos muito importantes no tratamento de infeções causada por estirpes multirresistentes (Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

Os *Enterococcus* tem a capacidade de atuar como reservatório de genes de resistência a antibióticos em alimentos (Pesavento *et al.*, 2014; Porto *et al.*, 2016). Tendo isso em consideração, foi feita a pesquisa de alguns genes de resistências nos isolados que demonstraram ser fenotipicamente resistente à tetraciclina (*tet(M)*), eritromicina (*erm(B)*) e vancomicina (*van(A)* *van(B)*). Posteriormente, compararam-se os resultados obtidos nos antibiogramas com os obtidos na pesquisa de genes de resistência (fenótipo *versus* genótipo).

Em relação à tetraciclina, observou-se que 100% (17/17) dos isolados fenotipicamente resistentes apresentam o gene *tet(M)*, o que está de acordo com outros estudos que mostram que é dos genes mais frequentes na origem da resistência a este agente (Wierzchowska *et al.*, 2020; Diarra *et al.*, 2010; Radhouani *et al.*, 2011). Outro gene também muito frequente nos *Enterococcus* responsável pela resistência à tetraciclina é o *tet(L)* (não pesquisado neste trabalho) (Valenzuela *et al.*, 2008).

Relativamente à eritromicina, 67% (4/6) dos isolados fenotipicamente resistentes apresentam o gene *erm(B)*, estando de acordo com outros estudos que mostram que *erm(B)* é dos genes mais frequentes na resistência a este antibiótico em *Enterococcus* (Barros *et al.*, 2011). Adicionalmente, é importante referir que um dos genes *erm(A)* ou *erm(C)* pode estar presentes nos dois isolados cuja presença do *erm(B)* não foi detetada (Aarestrup *et al.*, 2000). Seria interessante num próximo estudo verificar se realmente um desses genes é o responsável pela resistência à eritromicina observada nesses isolados.

Os genes *van(A)* e *van(B)* foram testados para o único isolado que mostrou ser fenotipicamente resistente à vancomicina, no entanto não obtivemos confirmação se a resistência era provocada por esses genes, uma vez que o controlo positivo para esses determinantes também não obteve as respetivas bandas (931 e 536pb). No entanto, o não aparecimento de produto de amplificação para estes genes também pode demonstrar que a resistência não era provocado pelo *van(A)* e *van(B)*, mas sim por outro determinante como o gene *van(C)*, o que é pouco provável porque o isolado pertence à espécie *E. durans* e a presença do gene *van(C)* é uma característica das espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (Dunny *et al.*, 1995).

### 3.3.2 Fatores de virulência

*Enterococcus* é o género das BAL que mais se destaca pela sua patogenicidade, por estarem muitas vezes associados a infeções. A presença de fatores de virulência nestes microrganismos contribui para a severidade das mesmas, uma vez que estão associado à colonização e invasão dos tecidos do hospedeiro, resistências específicas aos mecanismos de defesa do hospedeiro e podem também provocar alterações patológicas, por produção de toxinas (Franz *et al.*, 2011; Perin *et al.*, 2014). Além disso, há já muitos estudos que relatam a presença de muitos desses fatores de virulência em estirpes de origem alimentar, por isso foi avaliada a presença de alguns desses fatores, tanto fenotipicamente com genotipicamente.

A análise fenotípica foi realizada em testes em placa para testar a produção de hemolisina, gelatinase e protease, os resultados obtidos estão representados na Figura 3.8.

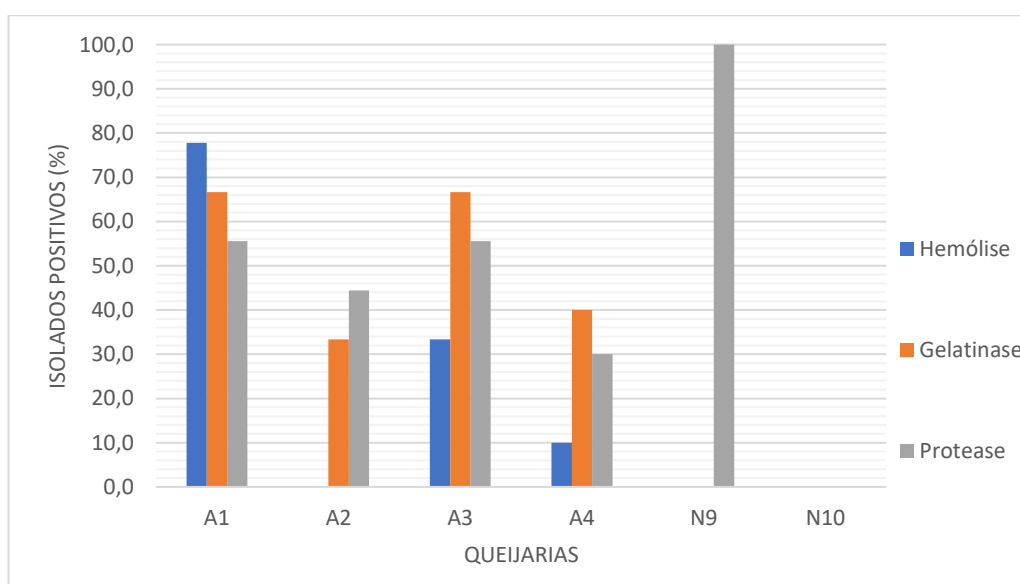


Figura 3.8: Análise da atividade fenotípica de fatores de virulência.

A presença da atividade hemolítica foi realizada em meio de cultura Columbia suplementado com 5% de sangue de cavalo. Apenas isolados que produziram hemólise completa ( $\beta$ -hemólise) foram considerados positivos. Tendo esse dado em consideração, houve um total de 26% (11/42) de resultados positivos, em que a maioria está presente na queijaria A1 (78%). Os resultados mostram que a produção de hemolisina não é exclusiva de isolados de origem clínica, no entanto esse facto já tinha sido demonstrado anteriormente (Semedo *et al.*, 2003) em que 6% de isolados extraídos de queijos DOP portugueses eram positivos para a hemólise completa.

A grande maioria dos representantes que identificados como  $\beta$ -hemolíticos pertencem à espécie *E. faecalis* e apenas um isolado é *E. durans*, o que está de acordo com relatos anteriores (Semedo *et al.*, 2003) que referem que a maioria dos isolados  $\beta$ -hemolíticos pertencem à espécie *E. faecalis* e *E. faecium* no entanto, o referido estudo demonstrou que esta característica é generalizada no género *Enterococcus*, pois também detectaram *E. avium*, *E. durans* e *E. casseliflavus*  $\beta$ -hemolíticos.

Quando comparamos os resultados obtidos neste estudo com os de anos anteriores (Rocha, 2019), percebemos que os queijos de 2019 (26%) contêm um maior número de isolados positivos, sendo que nos anos 2016 (11,8%), 2017 (6,5%) e 2018 (12,1%) a percentagem de  $\beta$ -hemolíticos foi menor. Uma possível explicação para essa diferença pode estar relacionada com os diferentes tipos de sangue

utilizados para suplementar o meio. Enquanto que no presente estudo se utilizou sangue de cavalo, no estudo anterior (Rocha, 2019) foi sangue de ovelha. Relatos de outros autores (Basinger and Jackson, 1968) já haviam demonstrado que alguns tipos de sangue, como o de ovelha e ganso, têm maior resistência à hemólise do que os de outros mamíferos, como os de cavalo, humano e coelho.

A atividade proteolítica nos *Enterococcus* pode ser avaliada em dois meios diferentes gelatinase e skim milk (Graham *et al.*, 2017).

Recorrendo ao meio Gelatinase peptone agar e através da formação de halos em torno da colônias, verificou-se que 45% (19/42) dos isolados eram gelatinase positivos, estudos anteriores mostraram que a gelatinase é um fator de virulência frequentemente observado (Barbosa *et al.*, 2010; Lindenstrauß *et al.*, 2011). Se relacionarmos os resultados obtidos com a espécie, vemos que todos os isolados produtores de gelatinase são *E. faecalis* com a exceção de um que pertence à espécie *E. durans*, o que demonstra o potencial patogénico da espécie *E. faecalis* (Diarra *et al.*, 2010). Em comparação com os resultados anteriores (Rocha, 2019), reparamos que os isolados dos queijos de 2019 voltam a apresentar maior percentagem de produção de gelatinase do que os isolados recolhidos em anos anteriores (2016-18). Seria interessante pesquisar nestes isolados a presença do gene *gelE*.

A formação de halos transparentes à volta das colônias foi também observada no meio com *skim-milk*, indicando que 40% (17/42) dos isolados apresentam atividade proteolítica. Diversos artigos afirmam que os *Enterococcus* são conhecidos por possuir um sistema proteolítico muito eficiente, podendo até ser vantajoso para as características sensoriais do queijo, como por exemplo o sabor agradável deste é uma consequência da atividade proteolítica dessas bactérias, através da libertação de certos compostos (aminoácidos) importantes (Biscola *et al.*, 2016; Serio *et al.*, 2010).

Os *Enterococcus* podem possuir no seu genoma diversos genes de virulência, portanto analisou-se a presença de alguns desses genes através da técnica de ampliação por *PCR*, utilizando *primers* específicos. Os genes testados incluíram duas adesinas, como a substância de agregação (*agg*) e a proteína de superfície (*esp*), e factores secretados como a gelatinase (*gelE*) e a citolisina (*cylA*). Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.9.

No caso dos isolados em que se observou a presença do *gelE* mas, no entanto, não foi obtido um resultado fenotípico positivo, pesquisou-se também a presença do gene *frsB*.

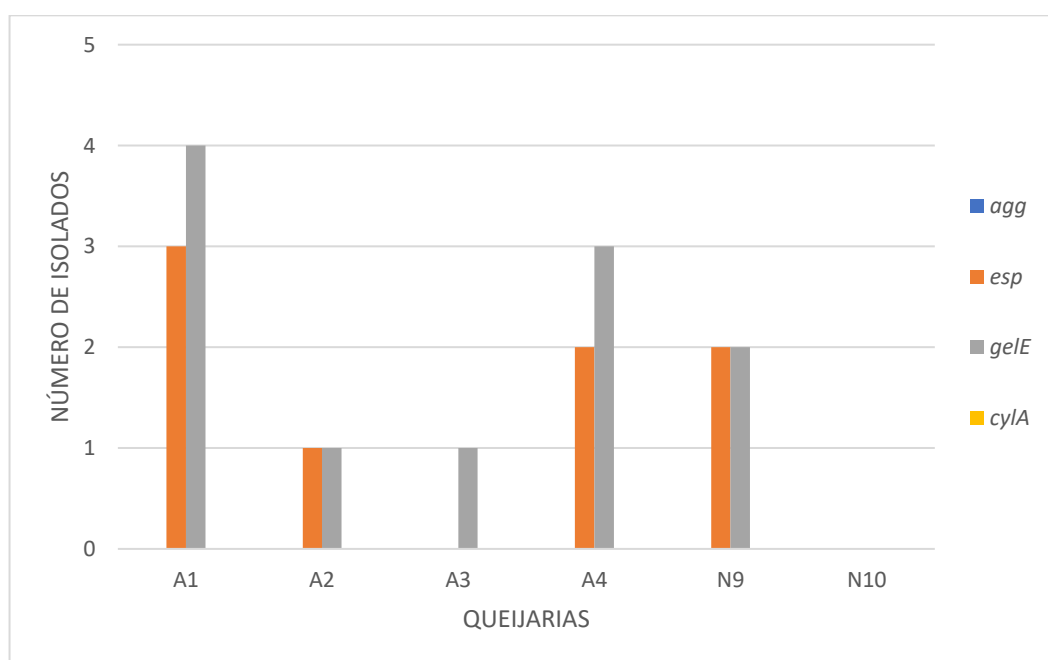


Figura 3.9: Resultados da análise de genes de virulência por queijaria.

Como se pode observar na Figura 3.9 não obtivemos isolados com os genes *agg* e *cylA*. Para um isolado poder ser  $\beta$ -hemolítico tem de possuir todo o conjunto de genes *cyl*. No entanto, 26% dos isolados demonstraram ser hemolíticos positivos, e não apresentavam do gene *cylA*. A existência de um elemento genético desconhecido responsável pela hemólise ou a variabilidade genética do gene *cylA* pode explicar então a presença de resultados de hemólise positiva e ao mesmo tempo a ausência do gene (Macovei and Zurek, 2007; Semedo *et al.*, 2003).

O gene *esp* foi detetado em 19% (8/42) dos isolados, pertencentes maioritariamente à espécie *E. faecalis* e apenas a um *E. durans*. Apesar de o gene estar mais associado às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, tivemos um isolado *E. durans* que apresentava o gene *esp*, segundo outro estudo já há informação de que este gene também pode estar presente noutras espécies como *E. durans*, no entanto não é muito comum (Trivedi *et al.*, 2011).

Em relação ao gene *gelE*, este foi detetado em 26% (11/42) dos isolados, este gene é encontrado com alguma frequência em estirpes proteolíticas com origem em produtos lácteos (Biscola *et al.*, 2016). No entanto, para alguns dos isolados positivos para a atividade da gelatinase o gene *gelE* não foi detetado. Em dois isolados aconteceu o oposto, possuem o gene *gelE* mas foram negativos para a atividade da gelatinase, este fenómeno pode ser explicado pela existência de uma deleção cromossomal contendo parte do *loci fsr*, que vai regular negativamente a expressão do gene *gelE* (Semedo, *et al.*, 2003). Para os dois isolados que mostraram ter *gelE* presente, mas eram fenotipicamente negativos, fez-se a pesquisa do gene *fsrB* e num dos isolados realmente não estava presente, explicando assim a situação mencionada. No entanto, no outro isolado que apresentou o gene *fsrB*, a situação pode ser explicada pela ausência de um dos outros dois genes *fsrA* e *fsrC* pertencentes ao *loci fsr*. Para confirmar esta justificação era necessária realização de um outro PCR-multiplex com *primers* específicos para esses dois genes.

## 4 Conclusões

Neste estudo foram analisados isolados provenientes de queijos de diferentes localizações geográficas (Nisa e Azeitão), produzidos no ano 2019, com a finalidade de realizar um estudo comparativo com os resultados obtidos em anos anteriores (2016, 2017, 2018).

As contagens de bactérias ácido lácticas, *Lactococcus* e *Enterococcus* foram coerentes com os resultados obtidos em estudos prévios, realizados em queijos tradicionais de leite cru (Cabezas *et al.*, 2007; Pintado *et al.*, 2008). Quando comparados os valores obtidos ao longo dos anos, foram detetadas algumas discrepâncias, que podem ser explicadas pela utilização de leite cru na produção desses queijos.

As contagens de BAL (isolados em meio MRS) e *Lactococcus* (meio M17) foram muito semelhantes, havendo uma diferença notória para as contagens de *Enterococcus* (isolados em meio SBA), que foram as mais baixas. Em relação aos queijos das diferentes regiões, percebemos que os queijos da região de Nisa apresentam contagens mais reduzidas do que os queijos da região de Azeitão, o que pode ser explicado pelo facto de o queijo de Nisa ser um queijo semi-duro e menos húmido com teor em sal mais elevado, não sendo estas condições favoráveis ao crescimento das BAL (principalmente ao género *Lactococcus*).

Posteriormente, foi analisada a diversidade dos microrganismos autóctones. Ao longo dos anos de produção, o ano de 2018 foi o que se destacou por ter maior diversidade, seguido do ano 2019. Ao longo dos quatro anos há uma tendência para as queijarias de Nisa apresentarem uma menor diversidade pois, como mencionado anteriormente, as características dos queijos desta região não apresentam condições tão favoráveis ao crescimento destas bactérias com os de Azeitão. Os resultados da diversidade dos *Enterococcus* não têm uma relação direta com as contagens, apesar de ter sido o grupo a apresentar menores contagens, obteve uma diversidade elevada podendo-se concluir que, mais importante que ter um elevado número de contagens, o que realmente parece fazer diferença é a elevada diversidade de *Enterococcus* presentes nos queijos em estudo. Com a análise do dendrograma que contém todos os isolados de 2019, verificámos que cada queijaria tem a sua própria microbiota, podendo estes microrganismos ser os responsáveis pelas propriedades organolépticas características de cada queijo, existindo apenas uma pequena minoria partilhada por diferentes queijarias.

Quanto à identificação dos *Enterococcus*, a espécie que mostrou maior dominância foi *E. faecalis* seguida por *E. faecium* e *E. durans*, sendo que alguns isolados não foram identificados ao nível de espécie.

Em relação às resistências a antibióticos, ao longo dos anos em estudo foram encontrados muitos isolados resistentes à quinupristina-dalfopristina, explicado, pelo facto de os *Enterococcus* serem intrinsecamente resistentes a esse antibiótico. Ao longo dos anos, os enterococos mostraram ter cada vez mais resistências a diferentes antibióticos, facto resultante da sua capacidade em adquirir novas resistências. No caso concreto dos isolados de 2019, foram encontradas resistências importantes, tais como à teicoplanina e vancomicina, por serem antibióticos de última linha no tratamento de infeções, à ciprofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina, por estarem na categoria de resistências adquiridas, que podem ser transferidas para outras bactérias pelos *Enterococcus*.

Foi encontrado um isolado multirresistente, sendo que a presença de apenas um multirresistente em 42 isolados não é uma situação muito grave, uma vez que o mesmo não apresenta resistência à gentamicina e vancomicina, que são antibióticos muito importantes no tratamento de infeções causadas por enterococos multirresistentes.

Dos quatros genes de resistências pesquisados, concluímos que o que estava mais presente era o *tet(M)* seguindo-se pelo *erm(B)*, o que mostrou estar de acordo com outros estudos (Wierzchowska *et al.*, 2020; Diarra *et al.*, 2010; Radhouani *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2011), que explicam serem estes os genes mais frequentes na origem da resistência à tetraciclina e eritromicina, respetivamente. Em relação



aos genes *van(A)* e *van(B)*, não foram detetados no isolado fenotipicamente resistente à vancomicina, não tendo sido possível demonstrar qual o gene responsável por essa resistência.

Quanto aos fatores de virulência estudados, concluímos que há uma maior percentagem de isolados positivos à gelatinase, sendo as queijarias A1 e A3 que contêm a grande maioria desses isolados. Seguindo-se pela protease com 40% de isolados positivos. Em relação à hemolisina, 26% dos isolados são  $\beta$ -hemolíticos e a maioria está presente na queijaria A1. Em relação aos outros anos em estudo, o ano de 2019 foi o que apresentou maior número de isolados positivos. Dos quatro genes de virulência estudados, verificamos que os mais frequentes foram *gelE* (26%) e *esp* (19%) e os determinantes de virulência *agg* e *cylA* estavam ausentes.

Em futuros trabalhos, seria interessante continuar a estudar-se a influência das BAL no fabrico de queijos tradicionais Portugueses, bem como a evolução da resistência a antibióticos e dos fatores de virulência, de forma a avaliar o potencial risco para a saúde pública.

## 5 Referências bibliográficas

- Aarestrup, F. M., Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, and L. B. Jensen. 2000. "Comparison of Antimicrobial Resistance Phenotypes and Resistance Genes in *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium* from Humans in the Community, Broilers, and Pigs in Denmark." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37(2):127–37.
- Aminov, R. I., N. Garrigues-Jeanjean, and R. I. Mackie. 2001. "Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins." *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 22–32.
- Arizcun, C., Y. Barcina, and P. Torre. 1997. "Identification and Characterization of Proteolytic Activity of *Enterococcus* Spp. Isolated from Milk and Roncal and Idiazabal Cheese." *International Journal of Food Microbiology* 38(1):17–24.
- Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin. (1993). "Characterization of Tn1546, a Tn3-Related Transposon Conferring Glycopeptide Resistance by Synthesis of Depsipeptide Peptidoglycan Precursors in *Enterococcus Faecium* BM4147." *Journal of Bacteriology* 175(1): 117–27.
- Aruna, M., P. Akins, M. E. Austin, and G. Kochert. 1993. "Genetic Relatedness among Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium Ashei*) Cultivars Determined by DNA Amplification Using Single Primers of Arbitrary Sequence." *Genome* 36(5):971–77.
- Batista, E. 2017. "Caracterização microbiológica e físico-química de queijos tradicionais Portugueses com Denominação de Origem Protegida."
- Barbosa, J., V. Ferreira, and P. Teixeira. 2009. "Antibiotic Susceptibility of *Enterococci* Isolated from Traditional Fermented Meat Products." *Food Microbiology* 26(5):527–32.
- Barbosa, J., P. A. Gibbs, and P. Teixeira. 2010. "Virulence Factors among *Enterococci* Isolated from Traditional Fermented Meat Products Produced in the North of Portugal." *Food Control* 21(5):651–56.
- Barbosa, J., S. Borges, and P. Teixeira, P. 2014. "Selection of Potential Probiotic *Enterococcus Faecium* Isolated from Portuguese Fermented Food." *International Journal of Food Microbiology* 191:144–48.
- Barros, J., Igrejas, G., Andrade, M., Radhouani, H., López, M., Torres, C. and Patrícia Poeta. 2011. "Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Carrying Antibiotic Resistant *Enterococci*. A Potential Bioindicator of Marine Contamination?" *Marine Pollution Bulletin* 62(6):1245–48.
- Basinger, S. F. and R. W. Jackson. 1968. "Bacteriocin (Hemolysin) of *Streptococcus Zymogenes*." *Journal of Bacteriology* 96(6):1895–1902.
- Bertrand, X., B., Mulin, J. F. Viel, M. Thouverez, and D. Talon. 2000. "Common PFGE Patterns in Antibiotic-Resistant *Enterococcus Faecalis* from Humans and Cheeses." *Food Microbiology* 17(5):543–51.
- Biscola, V., F. L. Tulini, Y. Choiset, H. Rabesona, I. Ivanova, J. M. Chobert, S. D. Todorov, T. Haertlé, and B. D. G. M. Franco. 2016. "Proteolytic Activity of *Enterococcus Faecalis* VB63F for Reduction of Allergenicity of Bovine Milk Proteins." *Journal of Dairy Science* 99(7):5144–54.
- Bonham, K. S., B. E. Wolfe, and R. J. Dutton. 2017. "Extensive Horizontal Gene Transfer in Cheese-Associated Bacteria." *ELife* 6.
- Busta, Francis F., C. W. Donnelly, P. A. Hall, A. D. Hocking, T. J. Montville, and R. B. Tompkin. 2006. *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*.
- Cabezas, L., I. Sánchez, J. M. Poveda, S. Seseña, and Ma LL Palop. 2007. "Comparison of Microflora, Chemical and Sensory Characteristics of Artisanal Manchego Cheeses from Two Dairies." *Food Control* 18(1):11–17.
- Caplice, E. and G. F. Fitzgerald. 1999. "Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation." *International Journal of Food Microbiology* 50(1–2):131–49.
- Caro, I., E. J. Quinto, L. Fuentes, V. Alessandria, L. S. Cocolin, M. P. Redondo-del-Río, B. Mayo, A. B. Flórez, and J. Mateo. 2020. "Characterization of *Lactococcus* Strains Isolated from Artisanal Oaxaca Cheese." *Lwt* 122:109041.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., A. Zadernowska, and M. García-Solache. 2020. "Ready-to-Eat Dairy

- Products as a Source of Multidrug-Resistant *Enterococcus* Strains: Phenotypic and Genotypic Characteristics.” *Journal of Dairy Science* 103(5):4068–77.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., A. Zadernowska, and L. Łaniewska-Trokenheim. 2017. “Virulence Factors of *Enterococcus* Spp. Presented in Food.” *LWT - Food Science and Technology* 75:670–76.
- Clementi, F. and L. Aquilanti. 2011. “Recent Investigations and Updated Criteria for the Assessment of Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria.” *Anaerobe* 17(6):394–98.
- Cocolin, L., K. Rantsiou, L. Iacumin, R. Urso, C. Cantoni, and G. Comi. 2004. “Study of the Ecology of Fresh Sausages and Characterization of Populations of Lactic Acid Bacteria by Molecular Methods.” *Applied and Environmental Microbiology* 70(4):1883–94.
- Conwell, M., V. Daniels, P. J. Naughton, and J. S. G. Dooley. 2017. “Interspecies Transfer of Vancomycin, Erythromycin and Tetracycline Resistance among *Enterococcus* Species Recovered from Agrarian Sources.” *BMC Microbiology* 17(1):1–8.
- Correia S., S., M.J. Fraqueza, M. Elias, A. S.Barreto, and T. Semedo-Lemsaddek. 2017. “Traditional Dry Smoked Fermented Meat Sausages: Characterization of Autochthonous *Enterococci*.” *LWT - Food Science and Technology* 79:410–15.
- Delpech, G., G. Pourcel, C. Schell, M. Luca, J. Basualdo, J. Bernstein, S. Grenovero, and M. Sparo. 2012. “Antimicrobial Resistance Profiles of *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium* Isolated from Artisanal Food of Animal Origin in Argentina.” *Foodborne Pathogens and Disease* 9(10):939–44.
- Demarigny, Y., E. Beuvier, S. Buchin, S. Pochet, and R. Grappin. 1997. “Influence of Raw Milk Microflora on the Characteristics of Swiss-Type Cheeses: II. Biochemical and Sensory Characteristics.” *Lait* 77(1):151–67.
- Devirgiliis, C., P. Zinno, and G. Perozzi. 2013. “Update on Antibiotic Resistance in Foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* Species.” *Frontiers in Microbiology* 4(OCT):1–13.
- Diarra, M. S., H. eidi Rempel, J. Champagne, L. Masson, J. Pritchard, and E. Topp. 2010. “Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* Spp. and Characterization of Isolates from Broiler Chickens.” *Applied and Environmental Microbiology* 76(24):8033–43.
- Dolci, P., V. Alessandria, K. Rantsiou, M. Bertolino, and L. Cocolin. 2010. “Microbial Diversity, Dynamics and Activity throughout Manufacturing and Ripening of Castelmagno PDO Cheese.” *International Journal of Food Microbiology* 143(1–2):71–75.
- Dolci, P., V. Alessandria, G. Zeppa, K. Rantsiou, and L. Cocolin. 2008. “Microbiological Characterization of Artisanal Raschera PDO Cheese: Analysis of Its Indigenous Lactic Acid Bacteria.” *Food Microbiology* 25(2):392–99.
- Drake, M., Ch. L. Small, K. D. Spence, and B. G. Swanson. 1996. “Rapid Detection and Identification of *Lactobacillus* Spp. in Dairy Products by Using the Polymerase Chain Reaction.” *Journal of Food Protection* 59(10):1031–36.
- Dunny, G. M., B. A. B. Leonard, and P. J. Hedberg. 1995. “Pheromone-Inducible Conjugation in *Enterococcus Faecalis*: Interbacterial and Host-Parasite Chemical Communication.” *Journal of Bacteriology* 177(4):871–76.
- Dutra, V., A. C. Silva, P. Cabrita, C. Peres, X. Malcata, and L. Brito. 2016. “*Lactobacillus Plantarum* LB95 Impairs the Virulence Potential of Gram-Positive and Gram-Negative Food-Borne Pathogens in HT-29 and Vero Cell Cultures.” *Journal of Medical Microbiology* 65(1):28–35.
- Eaton, T. J. and M. J. Gasson. 2001. “Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates.” *Applied and Environmental Microbiology* 67(4):1628–35.
- Elal Mus, T., F. Cetinkaya, R. Cibik, G. E. Soyutemiz, H. S., and N. Coplu. 2017. “Pathogenicity Determinants and Antibiotic Resistance Profiles of *Enterococci* from Foods of Animal Origin in Turkey.” *Acta Veterinaria Hungarica* 65(4):461–74.
- Elsayed, S., N. Hamilton, D. Boyd, M. Mulvey, R. Kariyama, R. Mitsuata, and H. Kumon. 2001. “Improved Primer Design for Multiplex PCR Analysis of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Spp. [3].” *Journal of Clinical Microbiology* 39(6):2367–68.
- Fitzsimons, N. A., T. M. Cogan, S. Condon, and T. Beresford. 1999. “Phenotypic and Genotypic Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Mature Cheddar Cheese.” *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3418–26.

- Flórez, A. B. and B. Mayo. 2006. "PCR-DGGE as a Tool for Characterizing Dominant Microbial Populations in the Spanish Blue-Veined Cabrales Cheese." *International Dairy Journal* 16(10):1205–10.
- Fonseca, J. (2010). "Avaliação Da Capacidade de Adesão e Produção de Biofilme Em Enterococos Clínicos e Alimentares."
- Fontana, Ce. F. Cappa, A. Rebecchi, and P. S. Cocconcelli. 2010. "Surface Microbiota Analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio Di Fossa Italian Cheeses." *International Journal of Food Microbiology* 138(3):205–11.
- Foulquié M., M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst. 2006. "The Role and Application of Enterococci in Food and Health." *International Journal of Food Microbiology* 106(1):1–24.
- Fox, P. F. and T. M. Cogan. 2004. "Factors That Affect the Quality of Cheese." *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* 1(C):583–608.
- Fox, P. F., P. L. H. Mcsweeney, and Nutritional Sciences. 2004. "Cheese : An Overview." 1.
- Franciosi, Elena, Luca Settanni, Agostino Cavazza, and Elisa Poznanski. 2009. "Biodiversity and Technological Potential of Wild Lactic Acid Bacteria from Raw Cows' Milk." *International Dairy Journal* 19(1):3–11.
- Franz, Charles M. A. P., Melanie Huch, Hikmate Abriouel, Wilhelm Holzapfel, and Antonio Gálvez. 2011. "Enterococci as Probiotics and Their Implications in Food Safety." *International Journal of Food Microbiology* 151(2):125–40.
- Franz, Ch.M. A. P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, and W. H. Holzapfel. 2001. "Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food." *Applied and Environmental Microbiology* 67(9):4385–89.
- Fraqueza, MJ. 2015. "Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dry-Fermented Sausages." *International Journal of Food Microbiology* 212:76–88.
- Freitas, A. C., A. C. Macedo, and F. X. Malcata. 2000. "Review: Technological and Organoleptic Issues Pertaining to Cheeses with Denomination of Origin Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks Revisión: Aspectos Tecnológicos y Sensoriales de Quesos Con Denominación de Origen Elaborado." *Food Science and Technology International* 6(5):351–70.
- Freitas, C. and F. X. Malcata. 2000. "Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'origine Protégée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks." *Journal of Dairy Science* 83(3):584–602.
- Friães, A., C. Resina, V. Manuel, L. Lito, M. Ramirez, and J. Melo-Cristino. 2015. "Epidemiological Survey of the First Case of Vancomycin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection in Europe." *Epidemiology and Infection* 143(4):745–48.
- Gaglio, R., N. C., C. Marques, M. F. S. Lopes, G. Moschetti, C. Pomba, and L. Settanni. 2016. "Evaluation of Antimicrobial Resistance and Virulence of Enterococci from Equipment Surfaces, Raw Materials, and Traditional Cheeses." *International Journal of Food Microbiology* 236:107–14.
- Gantzias, C., I. K. Lappa, M. Aerts, M. Georgalaki, E. Manolopoulou, K. Papadimitriou, E. Brandt, Effie Tsakalidou, and Peter Vandamme. 2020. "MALDI-TOF MS Profiling of Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Artisanal Cheeses of the Greek Island of Naxos." *International Journal of Food Microbiology* 323:108586.
- Giraffa, G.. 2002. "Enterococci from Foods." *FEMS Microbiology Reviews* 26(2):163–71.
- Giraffa, G.. 2003. "Functionality of Enterococci in Dairy Products." *International Journal of Food Microbiology* 88(2–3):215–22.
- Golob, M., M. Pate, D. Kušar, U. Dermota, J. Avberšek, B. Papić, I. Zdovc, and M. Bondi. 2019. "Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in Enterococcus Faecium and Enterococcus Faecalis from Humans and Retail Red Meat." *BioMed Research International* 2019:14–16.
- Gomes, B. C., P. R. F. Rosa, C. Etchebehere, E. L. Silva, and M. B. A. Varesche. 2015. "Role of Homo- and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria on Hydrogen-Producing Reactors Operated with Cheese Whey Wastewater." *International Journal of Hydrogen Energy* 40(28):8650–60.
- Gonçalves, M.T. P., M. J. Benito, M. de G. Córdoba, Co. Egas, A. V. Merchán, A. I. Galván, and S. Ruiz-Moyano. 2018. "Bacterial Communities in Serpa Cheese by Culture Dependent Techniques, 16S rRNA Gene Sequencing and High-Throughput Sequencing Analysis." *Journal of Food*

- Science* 83(5):1333–41.
- Gonzales, D., P. C. Schreckenberger, M. B. Graham, Swathi Kelkar, Karen DenBesten, and John P. Quinn. 2001. “Infections Due to Vancomycin-Resistant *Enterococcus Faecium* Resistant to Linezolid.” *Lancet* 357(9263):1179.
- Graham, K., R. Rea, P. Simpson, and H. Stack. 2017. “Development of a Rapid, One-Step Screening Method for the Isolation of Presumptive Proteolytic *Enterococci*.” *Journal of Microbiological Methods* 132:99–105.
- Hammad, A. M., H. y A. Hassan, and T. Shimamoto. 2015. “Prevalence, Antibiotic Resistance and Virulence of *Enterococcus* Spp. In Egyptian Fresh Raw Milk Cheese.” *Food Control* 50:815–20.
- Herreros, M. A., J. M. Fresno, M. J. González Prieto, and M. E. Tornadijo. 2003. “Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Armada Cheese (a Spanish Goats’ Milk Cheese).” *International Dairy Journal* 13(6):469–79.
- Hollenbeck, B. L. and L. B. Rice. 2012. “Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms in *Enterococcus*.” *Virulence* 3(5):421–569.
- Hunter, P. R. and M. A. Gaston. 1988. “Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: An Application of Simpson’s Index of Diversity.” *Journal of Clinical Microbiology* 26(11):2465–66.
- İspirli, H., F. Demirbaş, and E. Dertli. 2017. “Characterization of Functional Properties of *Enterococcus* Spp. Isolated from Turkish White Cheese.” *LWT - Food Science and Technology* file:///Users/Franciscausebio/Desktop/Artigos-Tese/Lab/1-S2.0-S0168160514004723-Main.Pdf 75:358–65.
- Jackson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, and J. B. Barrett. 2004. “Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of *Enterococci*.” *Journal of Clinical Microbiology* 42(8):3558–65.
- Jahan, M., George G. Zhanel, R. Sparling, and R. A. Holley. 2015. “Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance from *Enterococcus Faecium* of Fermented Meat Origin to Clinical Isolates of *E. Faecium* and *Enterococcus Faecalis*.” *International Journal of Food Microbiology* 199:78–85.
- Jurkovič, D., L. Križková, R. Dušínský, A. Belicová, M. Sojka, J. Krajčovič, and L. Ebringer. 2006. “Identification and Characterization of *Enterococci* from Bryndza Cheese.” *Letters in Applied Microbiology* 42(6):553–59.
- Kayser, F. H. 2003. “Safety Aspects of *Enterococci* from the Medical Point of View.” *International Journal of Food Microbiology* 88(2–3):255–62.
- Ke, D. F. J. P., F. Martineau, Ch. Ménard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron. 1999. “Development of a PCR Assay for Rapid Detection of *Enterococci*.” *Journal of Clinical Microbiology* 37(11):3497–3503.
- Kim, CMin-Chan and Gun-Jo Woo. 2016. “Characterization of Antimicrobial Resistance and Quinolone Resistance Factors in High-Level Ciprofloxacin-Resistant *Enterococcus Faecalis* and *E. Faecium* Isolates Obtained from Fresh Produce and Fecal Samples of Patients.” 28(3):303–25.
- Kongo, J. M., A. J. Ho, F. X. Malcata, and M. Wiedmann. 2007. “Characterization of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from São Jorge Cheese, Using Biochemical and Ribotyping Methods.” *Journal of Applied Microbiology* 103(5):1838–44.
- Kumar, A. and H. P. Schweizer. 2005. “Bacterial Resistance to Antibiotics: Active Efflux and Reduced Uptake.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(10):1486–1513.
- Kürekcı, C., S. P. r Önen, M. Yipel, Ö. Aslantas, and A. Gündoğdu. 2016. “Characterisation of Phenotypic and Genotypic Antibiotic Resistance Profile of *Enterococci* from Cheeses in Turkey.” *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 36(3):352–58.
- Lindenstrauß, A. G., M. Pavlovic, A. Bringmann, J. Behr, M. A. Ehrmann, and R. F. Vogel. 2011. “Comparison of Genotypic and Phenotypic Cluster Analyses of Virulence Determinants and Possible Role of CRISPR Elements towards Their Incidence in *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium*.” *Systematic and Applied Microbiology* 34(8):553–60.
- Londoño Z., A. Felipe, M. M. D. Zuleta, J. U. S. Valencia, and C. X. M. Herrera. 2017. “Characterization of Lactic Acid Bacterial Communities Associated with a Traditional Colombian Cheese: Double Cream Cheese.” *LWT - Food Science and Technology* 82:39–48.
- Lopes, M. de F. S., A. P. Simões, R. Tenreiro, J. J. F. Marques, and M. T. B. Crespo. 2006. “Activity and Expression of a Virulence Factor, Gelatinase, in Dairy *Enterococci*.” *International Journal of*

- Food Microbiology* 112(3):208–14.
- Macedo, A. C., T. G. Tavares, and F. X. Malcata. 2004. "Influence of Native Lactic Acid Bacteria on the Microbiological, Biochemical and Sensory Profiles of Serra Da Estrela Cheese." *Food Microbiology* 21(2):233–40.
- Macovei, L. and L. Zurek. 2006. "Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of Enterococci from Houseflies Collected in Food Settings." *Applied and Environmental Microbiology* 72(6):4028–35.
- Macovei, L. and L. Zurek. 2007. "Influx of Enterococci and Associated Antibiotic Resistance and Virulence Genes from Ready-to-Eat Food to the Human Digestive Tract." *Applied and Environmental Microbiology* 73(21):6740–47.
- Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet. 2012. "Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance." *Clinical Microbiology and Infection* 18(3):268–81.
- Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, M. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J. H. Lee, I. Díaz-Muñoz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills. 2006. "Comparative Genomics of the Lactic Acid Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(42):15611–16.
- Man, De. 1995. "De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar." *Progress in Industrial Microbiology* 34(C):362–63.
- Manson, J. M., S. Keis, J. M. B. Smith, and G. M. Cook. 2003. "Characterization of a Vancomycin-Resistant Enterococcus Faecalis (VREF) Isolate from a Dog with Mastitis: Further Evidence of a Clonal Lineage of VREF in New Zealand." *Journal of Clinical Microbiology* 41(7):3331–33.
- Marshall, B. M., D. J. Ochieng, and S. B. Levy. 2009. *Commensals: Underappreciated Reservoir of Antibiotic Resistance*. Vol. 4.
- Mathur, S. and R. Singh. 2005. "Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria - A Review." *International Journal of Food Microbiology* 105(3):281–95.
- McAuley, C. M., M. L. Britz, K. S. Gobius, and H. M. Craven. 2015. "Prevalence, Seasonality, and Growth of Enterococci in Raw and Pasteurized Milk in Victoria, Australia." *Journal of Dairy Science* 98(12):8348–58.
- Meng, Z., L. Zhang, L. Xin, K. Lin, H. X.Yi, and X. Han. 2018. "Technological Characterization of Lactobacillus in Semihard Artisanal Goat Cheeses from Different Mediterranean Areas for Potential Use as Nonstarter Lactic Acid Bacteria." *Journal of Dairy Science* 101(4):2887–96.
- Millar, B. C., X. Jiru, J. E. Moore, and J. A. P. Earle. 2000. "A Simple and Sensitive Method to Extract Bacterial, Yeast and Fungal DNA from Blood Culture Material." *Journal of Microbiological Methods* 42(2):139–47.
- Nieto-A., Pedro, S. Seseña, J. M. Poveda, R. Chicón, L. Cabezas, and L. Palop. 2011. "Enterococcus Populations in Artisanal Manchego Cheese: Biodiversity, Technological and Safety Aspects." *Food Microbiology* 28(5):891–99.
- O'Brien, Nora M. and Thomas P. O'Connor. 2017. "Nutritional Aspects of Cheese." *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* 1:603–11.
- Ogier, J. C. and P. Serror. 2008. "Safety Assessment of Dairy Microorganisms: The Enterococcus Genus." *International Journal of Food Microbiology* 126(3):291–301.
- Ortigosa, M., A. Irigoyen, M. Urdin, S. García, F. C. Ibañez, and P. Torre. 2008. "Sources of Enterococci in Idiazábal-Type Cheese." *International Journal of Food Microbiology* 125(2):146–52.
- Rocha, P.(2019). "Characterization of bacteria isolated from Portuguese traditional cheeses."
- Parente, E., T. M. Cogan, and I. B. Powell. 2004. "Starter Cultures: General Aspects." *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* 1:201–26.

- Perin, L. M., R. O. Miranda, S. D. Todorov, B. D. G. de M. Franco, and L. A. Nero. 2014. "Virulence, Antibiotic Resistance and Biogenic Amines of Bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci Isolated from Goat Milk." *International Journal of Food Microbiology* 185:121–26.
- Pesavento, G., C. Calónico, B. Ducci, A. Magnanini, and A. Lo Nostro. 2014. "Prevalence and Antibiotic Resistance of Enterococcus Spp. Isolated from Retail Cheese, Ready-to-Eat Salads, Ham, and Raw Meat." *Food Microbiology* 41:1–7.
- Pieniz, S., T. Martin de Moura, A.P. V. Cassenego, R. Andreazza, A. P. G. Frazzon, F. A. de O. Camargo, and A. Brandelli. 2015. "Evaluation of Resistance Genes and Virulence Factors in a Food Isolated Enterococcus Durans with Potential Probiotic Effect." *Food Control* 51:49–54.
- Pimentel, L. L., T. Semedo, R. Tenreiro, M. T. B. Crespo, M. M. E. Pintado, and F. X. Malcata. 2007. "Assessment of Safety of Enterococci Isolated throughout Traditional Terrincho Cheesemaking: Virulence Factors and Antibiotic Susceptibility." *Journal of Food Protection* 70(9):2161–67.
- Pintado, A. I. E., O. Pinho, I. M. P. L. V. O. Ferreira, M. Manuela E. Pintado, A. M. P. Gomes, and F. X. Malcata. 2008. "Microbiological, Biochemical and Biogenic Amine Profiles of Terrincho Cheese Manufactured in Several Dairy Farms." *International Dairy Journal* 18(6):631–40.
- Plumed, F., C., A. Barberio, R. Franklin-Guild, B. Werner, P. McDonough, J. Bennett, G. Gioia, N. Rota, F. Welcome, D. V. Nydam, and P. Moroni. 2015. "Antimicrobial Susceptibilities and Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Fingerprint Characterization of Lactococcus Lactis Ssp. Lactis and Lactococcus Garvieae Isolated from Bovine Intramammary Infections." *Journal of Dairy Science* 98(9):6216–25.
- Pogačić, T., A. Mancini, M. Santarelli, B. Bottari, C. Lazzi, E. Neviani, and M. Gatti. 2013. "Diversity and Dynamic of Lactic Acid Bacteria Strains during Aging of along Ripened Hard Cheese Produced from Raw Milk and Undefined Natural Starter." *Food Microbiology* 36(2):207–15.
- Porto, B. Ca., G. Fujimoto, M. de F. Borges, L. M. Bruno, and J. D. G. Carvalho. 2016. "Determinantes de Virulência Em Enterococcus Endógenos de Queijo Artesanal." *Revista Ciencia Agronomica* 47(1):69–76.
- Quigley, Li., O. O'Sullivan, C. Stanton, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and P. D. Cotter. 2013. "The Complex Microbiota of Raw Milk." *FEMS Microbiology Reviews* 37(5):664–98.
- Radhouani, H., G. Igrejas, L. Pinto, A. Gonalves, C. Coelho, J. Rodrigues, and P. Poeta. 2011. "Molecular Characterization of Antibiotic Resistance in Enterococci Recovered from Seagulls (Larus Cachinnans) Representing an Environmental Health Problem." *Journal of Environmental Monitoring* 13(8):2227–33.
- Randazzo, C. L., C. Caggia, and E. Neviani. 2009. "Application of Molecular Approaches to Study Lactic Acid Bacteria in Artisanal Cheeses." *Journal of Microbiological Methods* 78(1):1–9.
- Riquelme, C., S. Câmara, M. de L. N. E. Dapkevicius, P. Vinuesa, C. C. G. da Silva, F. X. Malcata, and O. A. Rego. 2015. "Characterization of the Bacterial Biodiversity in Pico Cheese (an Artisanal Azorean Food)." *International Journal of Food Microbiology* 192:86–94.
- Rodríguez-R., A., J. R. Beltrán, A. Couce, and J. Blázquez. 2013. "Antibiotics and Antibiotic Resistance: A Bitter Fight against Evolution." *International Journal of Medical Microbiology* 303(6–7):293–97.
- Rossetti, L., D. Carminati, M. Zago, and G. Giraffa. 2009. "A Qualified Presumption of Safety Approach for the Safety Assessment of Grana Padano Whey Starters." *International Journal of Food Microbiology* 130(1):70–73.
- Rózańska, H., A. Lewtak-Piłat, M. Kubajka, and M. Weiner. 2019. "Occurrence of Enterococci in Mastitic Cow's Milk and Their Antimicrobial Resistance." *Journal of Veterinary Research (Poland)* 63(1):93–97.
- Ruivo, M. (2018). "Caracterização do microbioma de queijos tradicionais Portugueses com DOP".
- Russo, N., C. Caggia, A. Pino, T. M. Coque, S. Arioli, and C. L. Randazzo. 2018a. "Enterococcus Spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano Cheese Types: A Snapshot of Their Antibiotic Resistance Distribution." *Food and Chemical Toxicology* 120(June):277–86.
- Santos, V., A. Barreto, and T. Semedo-Lemsaddek. 2015. "Characterization of Enterococci from Food and Food-Related Settings." *Journal of Food Protection* 78:1320–26.
- Sedgley, C. M. 2007. "The Influence of Root Canal Sealer on Extended Intracanal Survival of Enterococcus Faecalis With and Without Gelatinase Production Ability in Obturated Root Canals." *Journal of Endodontics* 33(5):561–66.

- Semedo, T., M. A. Santos, M. F. S. Lopes, J. J. F. Marques, M. T. B. Crespo, and R. Tenreiro. 2003. "Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A Common Trait in the Genus?" *Systematic and Applied Microbiology* 26(1):13–22.
- Semedo, T., M. A. Santos, P. Martins, M. F. S. Lopes, J. J. F. Marques, R. Tenreiro, and M. T. B. Crespo. 2003. "Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates to Examine Hemolytic Activity and Occurrence of the Cyl Operon in Enterococci." *Journal of Clinical Microbiology* 41(6):2569–76.
- Serio, A., C. Chaves-López, A. Paparella, and G. Suzzi. 2010. "Evaluation of Metabolic Activities of Enterococci Isolated from Pecorino Abruzzese Cheese." *International Dairy Journal* 20(7):459–64.
- Serio, A., A. Paparella, C. Chavez-López, A. Corsetti, and G. Suzzi. 2007. "Enterococcus Populations in Pecorino Abruzzese Cheese: Biodiversity and Safety Aspects." *Journal of Food Protection* 70(7):1561–68.
- Settanni, L. and G. Moschetti. 2010. "Non-Starter Lactic Acid Bacteria Used to Improve Cheese Quality and Provide Health Benefits." *Food Microbiology* 27(6):691–97.
- Santos, S., V., A. S. Barreto, and T. Semedo-Lemsaddek. 2015. "Characterization of Enterococci from Food and Food-Related Settings." *Journal of Food Protection* 78(7):1320–26.
- Soomro, A. H. and T. Masud and Kiran Anwaar. 2002. "Role of LAB in Food Preservation & Human Health.Pdf." 20–24.
- Su, Y. A., M. C. Sulavik, P. He, K. K. Makinen, P. L. Makinen, S. Fiedler, R. Wirth, and D. B. Clewell. 1991. "Nucleotide Sequence of the Gelatinase Gene (GelE) from Enterococcus Faecalis Subsp. Liquefaciens." *Infection and Immunity* 59(1):415–20.
- Sukmawinata, E., W. Sato, R. Uemura, and M. Sueyoshi. 2018. "Antimicrobial Resistant Enterococcus Faecium, Enterococcus Faecalis, and Other Enterococcus Species Isolated From Foal Feces in Japan." *Journal of Equine Veterinary Science* 63:51–54.
- Švec, P., M. Vancanneyt, M. Seman, C. Snauwaert, K. Lefebvre, I. Sedláček, and J. Swings. 2005. "Evaluation of (GTG)5-PCR for Identification of Enterococcus Spp." *FEMS Microbiology Letters* 247(1):59–63.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, and R. V. Goering. 1997. "How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists." *Infection Control and Hospital Epidemiology* 18(6):426–39.
- Tilocca, B., N. Costanzo, V. M. Morittu, A. A. Spina, A. Soggiu, D. Britti, P. Roncada, and C. Piras. 2020. "Milk Microbiota: Characterization Methods and Role in Cheese Production." *Journal of Proteomics* 210(September 2019):103534.
- Tramer, Elliot J. 1969. "Bird Species Diversity: Components of Shannon's Formula." *Ecology* 50(5):927–29.
- Trivedi, K., S. Cupakova, and R. Karpiskova. 2011. "Virulence Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Food-Things." *Veterinarni Medicina* 56(7):352–57.
- Tynkkynen, S., K. V. Singh, and P. Varmanen. 1998. "Vancomycin Resistance Factor of Lactobacillus Rhamnosus GG in Relation to Enterococcal Vancomycin Resistance (van) Genes." *International Journal of Food Microbiology* 41(3):195–204.
- Valenzuela, A. S., N. B. Omar, H. Abriouel, R. L. López, E. Ortega, M. M. Cañamero, and A. Gálvez. 2008. "Risk Factors in Enterococci Isolated from Foods in Morocco: Determination of Antimicrobial Resistance and Incidence of Virulence Traits." *Food and Chemical Toxicology* 46(8):2648–52.
- Yean, C. Y., L. S. Yin, P. Lalitha, and M. Ravichandran. 2007. "A Nanoplex PCR Assay for the Rapid Detection of Vancomycin and Bifunctional Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococcus Species." *BMC Microbiology* 7:1–8.



Apêndice A - Dendrogramas utilizados na análise de diversidade e na escolha dos representantes  
*Enterococcus* spp.

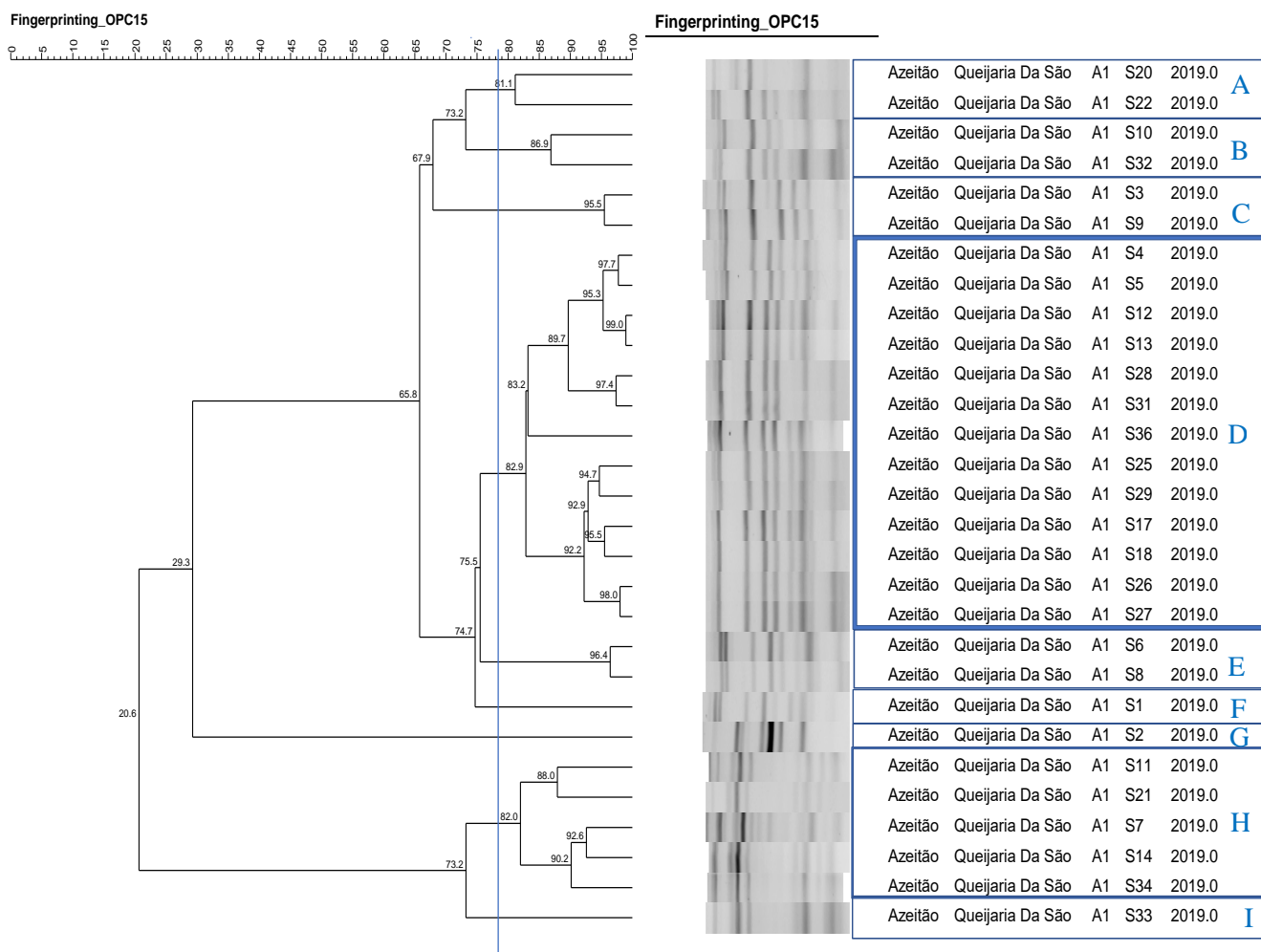


Figura A1: Dendrograma de *Enterococcus* isolados da queijaria A1. O índice de reprodutibilidade corresponde a 78,08% (linha azul) e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados. Na queijaria A1 foram identificados nove *clusters*, três deles com apenas um membro (*single member clusters*).

Fingerprinting\_OPC15

Fingerprinting\_OPC15

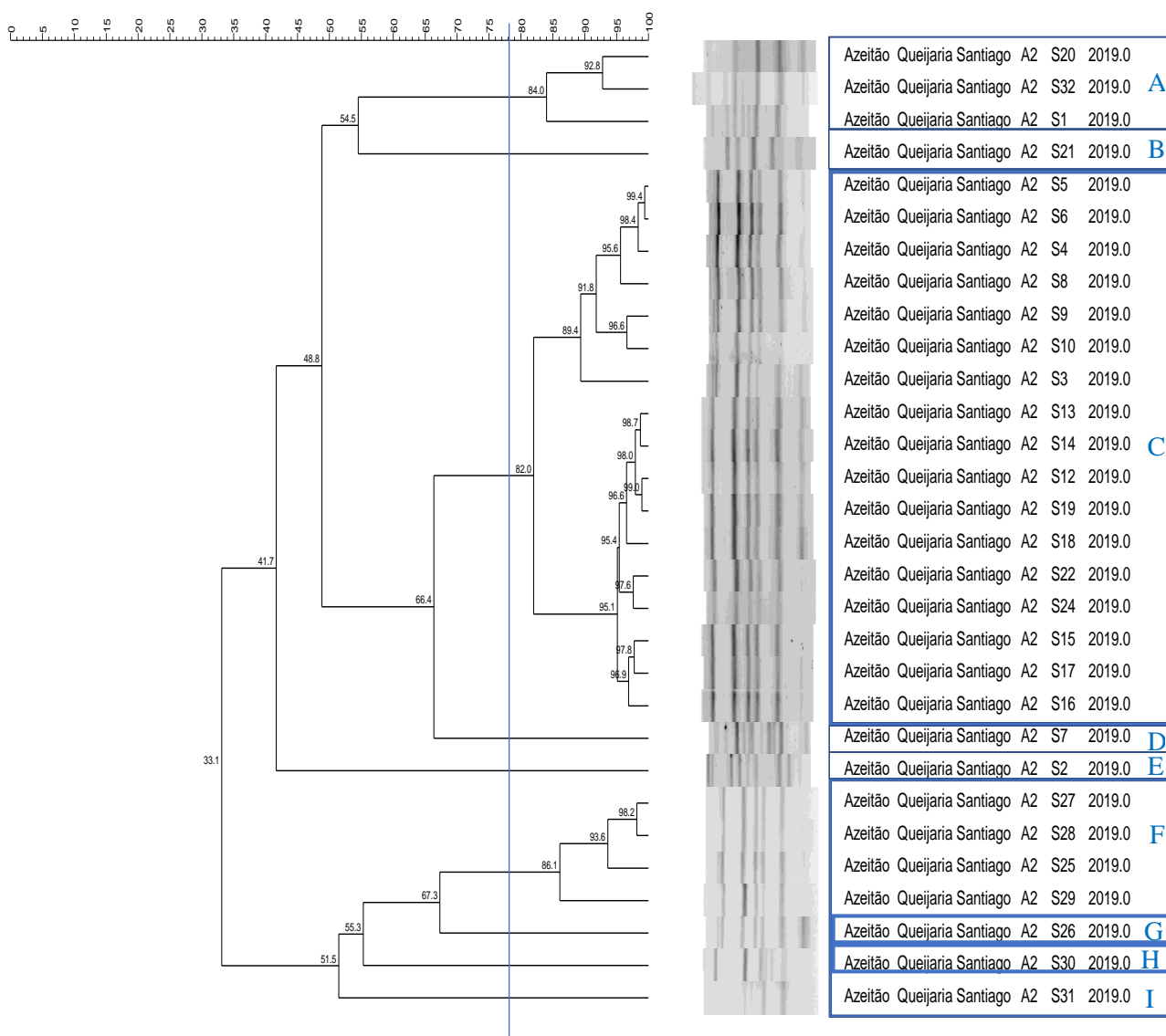


Figura A2: Dendrograma de *Enterococcus* isolados da queijaria A2. O índice de reprodutibilidade corresponde a 78,08% (linha azul) e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados. Na queijaria A2 foram identificados nove clusters, seis deles com apenas um membro (*single member clusters*).

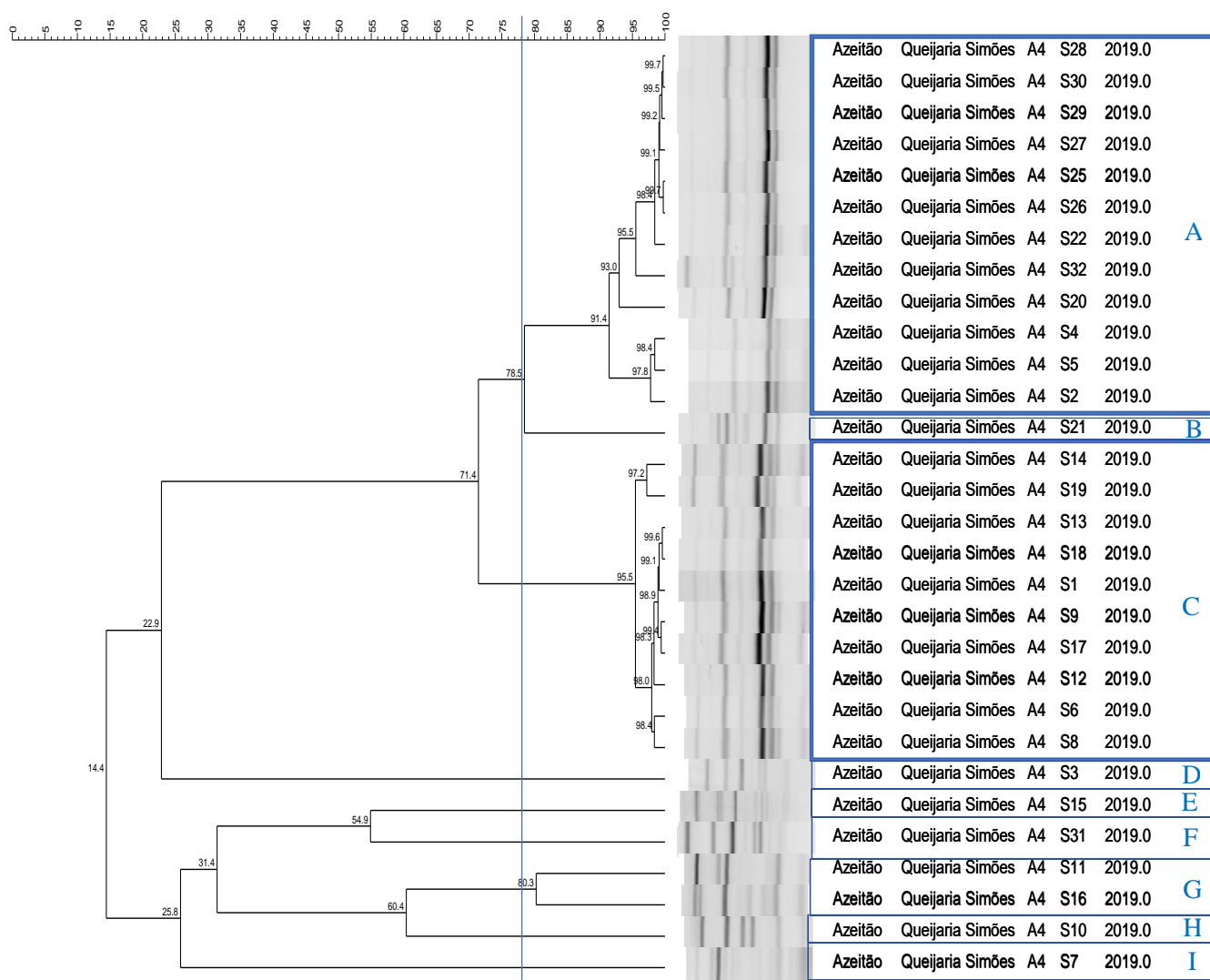


Figura A3: Dendrograma de *Enterococcus* isolados da queijaria A4. O índice de reprodutibilidade corresponde a 78,08% (linha azul) e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados. Na queijaria A4 foram identificados nove clusters, seis deles com apenas um membro (*single member clusters*).

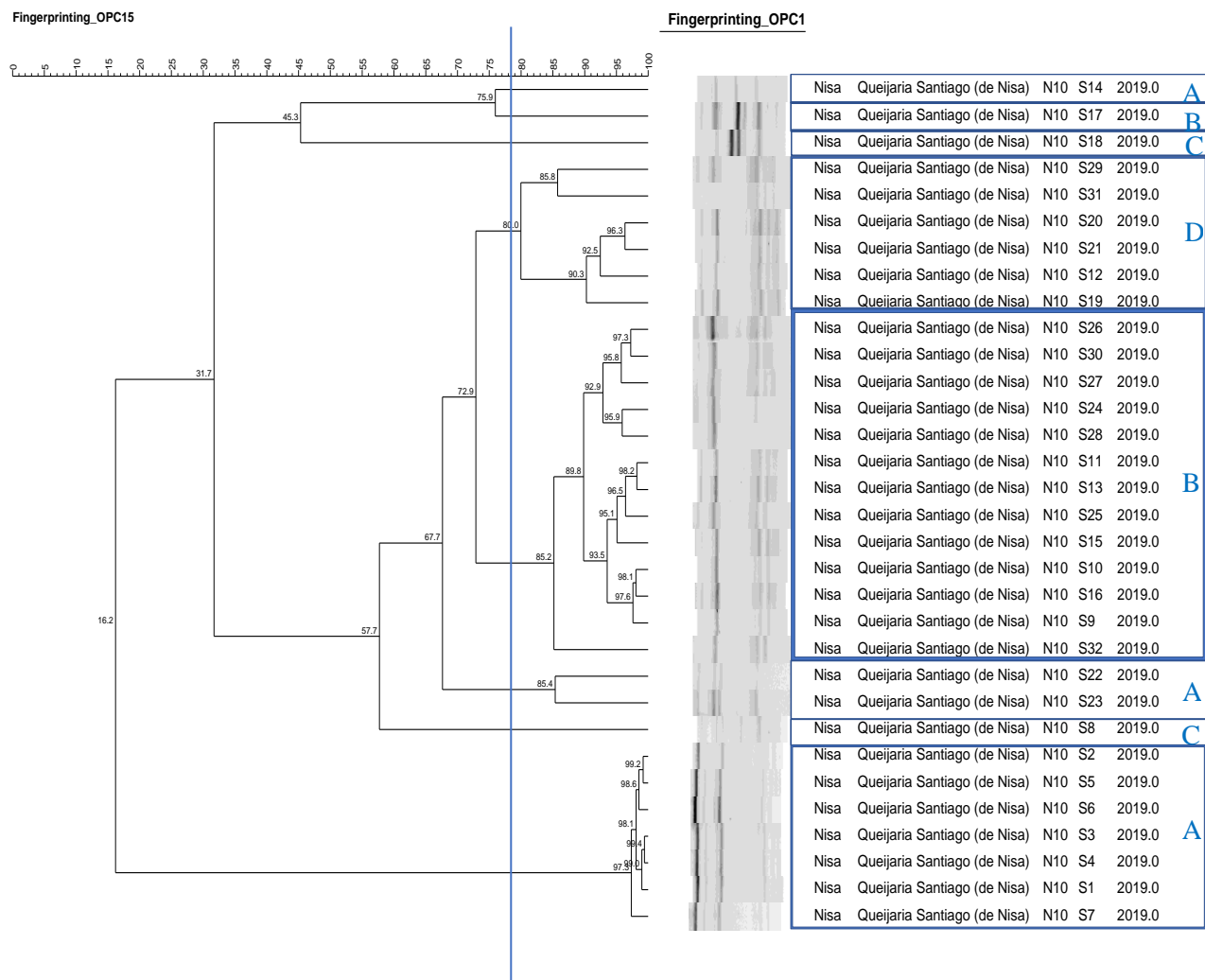


Figura A4: Dendrograma de *Enterococcus* isolados da queijaria N10. O índice de reprodutibilidade corresponde a 78,08% (linha azul) e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados. Na queijaria N10 foram identificados três *clusters* após confirmação dos níveis de semelhança entre isolados, o *cluster A* tem dez isolados, o *cluster B* tem 20 isolados e o *cluster C* tem 2 isolados.

## Apêndice B – Dendrogramas dos isolados *Enterococcus* spp.

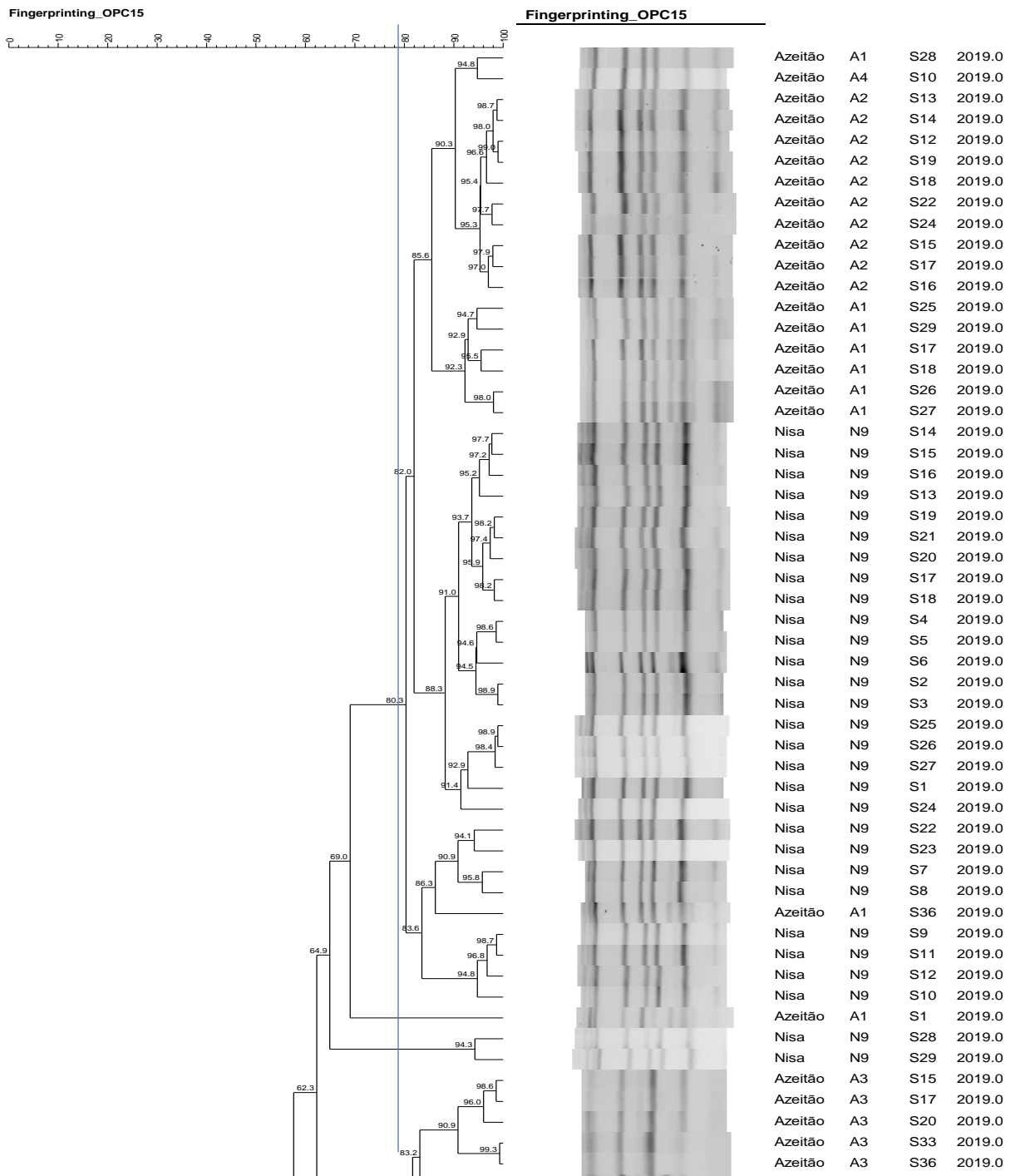


Figura B.1: Primeira parte do dendrograma de todos os *Enterococcus* spp. com o índice de reprodutibilidade marcado com a linha azul.

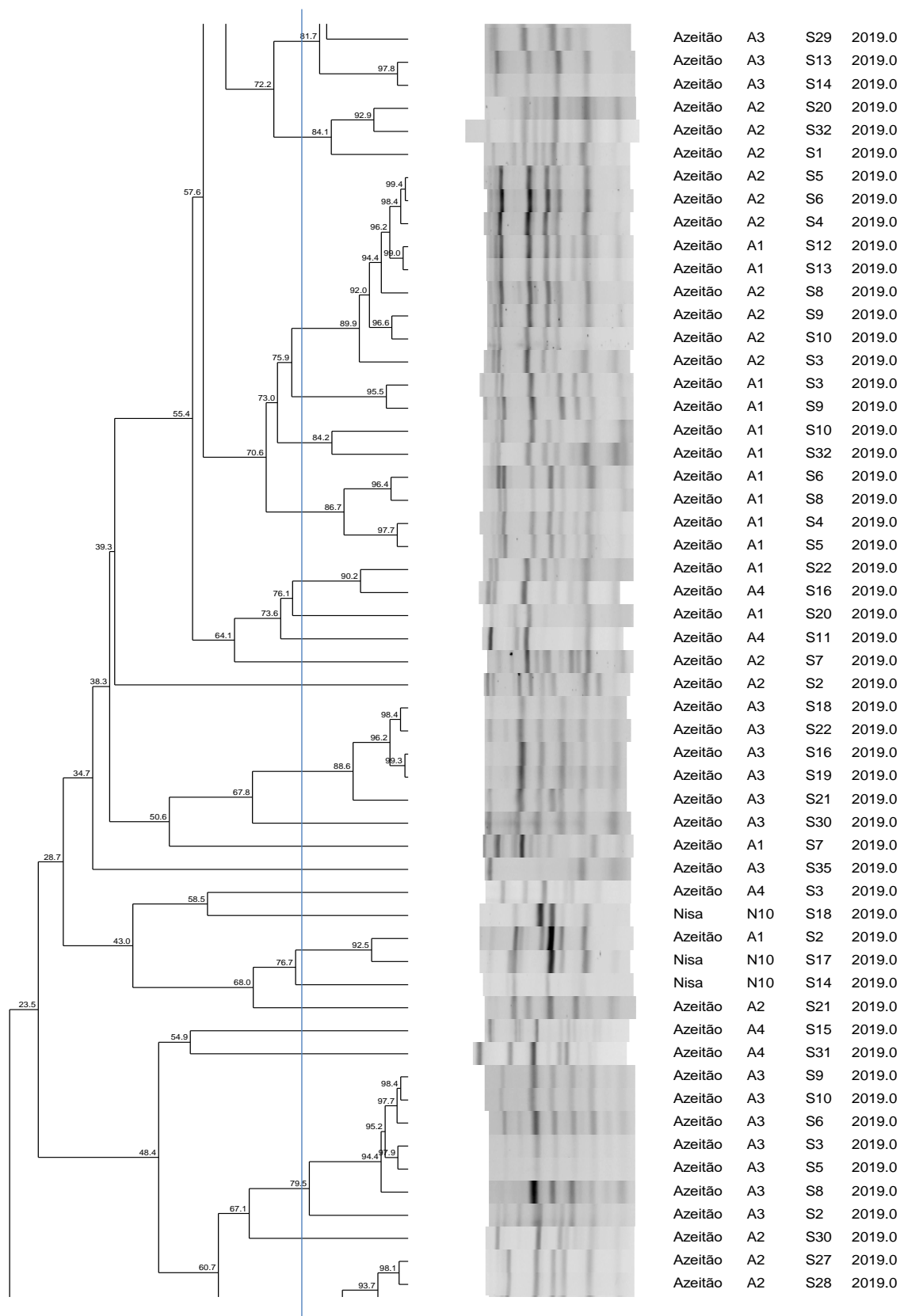


Figura B.2: Segunda parte do dendrograma de todos os *Enterococcus* spp. com o índice de reprodutibilidade marcado com a linha azul.

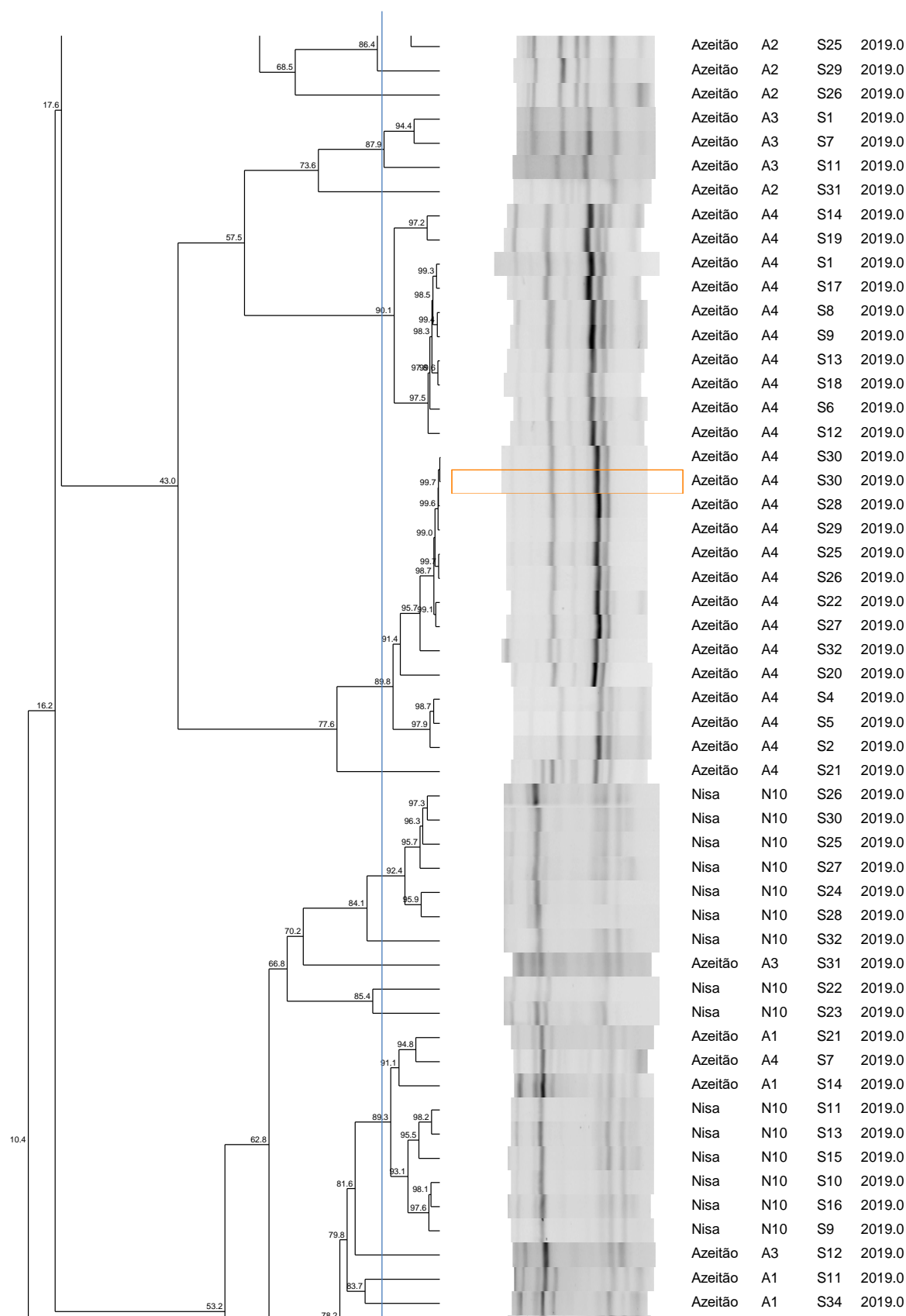


Figura B.3: Terceira parte do dendrograma de todos os *Enterococcus* spp. com o índice de reprodutibilidade marcado com a linha azul.

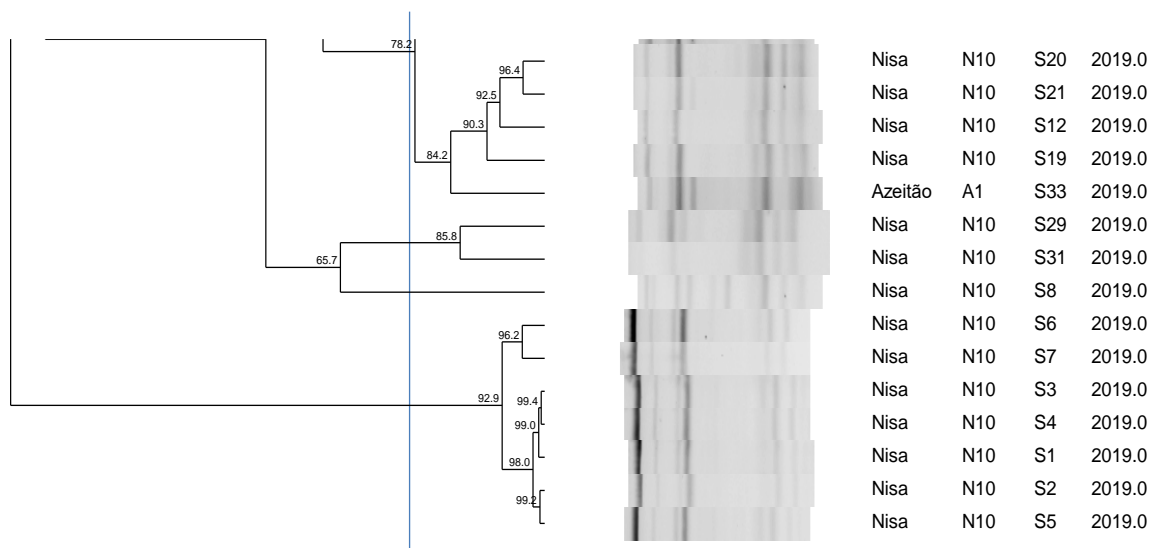


Figura B.4: Quarta parte do dendrograma de todos os *Enterococcus* spp. com o índice de reprodutibilidade marcado com a linha azul.